

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Inhibiční faktor migrace makrofágů a jeho role u nádorových
onemocnění**

Macrophage migration inhibitory factor and its role in cancer

Bakalářská práce

Jana Holecová

Vedoucí práce: RNDr. Jitka Pojlaková, Ph. D.

Praha 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením mé školitelky RNDr. Jitky Poljakové, Ph.D. a veškerou použitou literaturu jsem řádně citovala.

V Praze dne

Podpis

Poděkování:

Mé poděkování patří RNDr. Jitce Poljakové, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

Abstrakt

Inhibiční faktor migrace makrofágů (MIF) je prozánětlivý cytokin hrající důležitou roli v rámci vrozené i získané imunity. Jako enzym je schopen katalyzovat tautomerasové a oxidoreduktasové reakce. Na hormonální úrovni MIF působí proti imunosupresivnímu účinku glukokortikoidů a slouží jako regulátor stálé hladiny glukosy. V místech zánětů je MIF schopen potlačovat odpověď makrofágů na apoptotické signály vyvolané proteinem p53. Tato spojitost je zásadní u tkání postižených chronickým zánětlivým onemocněním, během kterého se MIF vyskytuje v tkáni dlouhodobě a umožňuje tak akumulaci potenciálních onkogenních mutací. Inhibiční faktor migrace makrofágů je ve zvýšené míře exprimován v nádorových buňkách, kde podporuje tvorbu krevních cév a buněčnou proliferaci a představuje tak přímé spojení mezi záněty a nádorovým onemocněním. Experimenty na modelových organismech ukazují, že podání inhibitoru MIF vede k opožděné progresi nádoru a prodlužuje délku přežití modelových organismů.

Abstract

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a pro-inflammatory cytokine that plays an essential role in both innate and acquired immunity. As an enzyme, MIF exhibits tautomerase and oxidoreductase activity. As a hormone, MIF has the ability to directly regulate the immunosuppressive actions of glucocorticoids and also affects glucose homeostasis. At the site of inflammation, MIF is able to suppress the response of macrophages to p53-mediated apoptotic signals. This connection is important in tissues suffering from chronic inflammatory disease, if MIF occurs in some tissue over a long period, it enables the accumulation of potentially oncogenic mutations. Macrophage migration inhibitory factor is expressed on high levels in tumor cells and promotes angiogenesis and cell proliferation and thereby represents direct link between inflammation and cancer. Experiments on model organism show that application of MIF-inhibitor leads to delayed tumor progression and prolonged survival of mice.

In czech.

Obsah

1	Seznam použitých zkratek	7
2	Úvod	9
3	Cíl práce	10
4	Přehled literatury	11
4.1	Gen kódující MIF a primární struktura molekuly	11
4.2	Krystalografické stanovení struktury MIF	13
4.3	Enzymatická funkce inhibičního faktoru migrace makrofágů	15
4.3.1	Tautomerasová aktivita MIF	15
4.3.2	Oxidoreduktasová aktivita MIF	18
4.4	Chaperonová aktivita inhibičního faktoru migrace makrofágů	19
4.5	Lokalizace MIF v lidském organismu	20
4.6	Hormonální funkce inhibičního faktoru migrace makrofágů	22
4.6.1	Vliv MIF na metabolismus glukosy	22
4.6.2	MIF jako negativní regulátor účinku glukokortikoidů	25
4.7	Role inhibičního faktoru migrace makrofágů v imunitním systému	27
4.7.1	Molekulární mechanismus účinku MIF	27
4.7.2	Role MIF v rámci vrozené a získané imunity	29
4.7.3	Inhibice aktivity p53	32
4.8	Inhibiční faktor migrace makrofágů a jeho role u nádorových onemocnění	34
4.8.1	Nádorová onemocnění a chronické zánětlivé procesy	35
4.8.2	Vliv MIF na angiogenezi	38
4.9	Využití inhibičního faktoru migrace makrofágů k diagnostickým účelům	41
4.10	Inhibitory MIF	42
5	Závěr	45
6	Citovaná literatura	46

1 Seznam použitých zkratk

4-IPP	4-jodo-6-fenylpyrimidin
4-OT	4-oxokrotonát tautomerasa
AP1	aktivační protein 1
bFGF	bazální fibroblastový růstový faktor
bp	páry bazí (z angl. "base pairs")
CD44	z angl. "cluster of differentiation 44"
CD74	z angl. "cluster of differentiation 74"
COX2	cyklooxygenasa 2
DDT	D-dopachrom tautomerasa
DHI	5,6-dihydroxyindol
DHICA	5,6-dihydroxyindol-2-karboxylová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ERK 1 a 2	kinasy regulované extracelulárním signálem
GILZ	glukokortikoidy indukovaný leucinový zip (z angl. "glucocorticoid-induced leucine zipper")
HIF-1 α	hypoxií indukovaný faktor 1 α (z angl. "hypoxia-inducible factor")
HPO	hepatopoietin
CHMI	5-karboxymethyl-2-hydroxymukonát isomerasa
ICAM	intracelulární buněčné adhezní molekuly
IFN- γ	interferon γ
IL-8	interleukin 8
JAB 1	c-Jun aktivační doménu vázající protein
LPS	lipopolysacharidy
MAPK	mitogenem p38 aktivovaná protein kinasa
MCP	chemoatraktant monocytů
MIF	inhibiční faktor migrace makrofágů
NF- κ B	jaderný faktor interagující s enhancerem genu pro lehký řetězec κ u aktivovaných B-lymfocytů
NO	oxid dusný

p115	protein o molekulové hmotnosti 115 kDa
p53	protein o molekulové hmotnosti 53 kDa
PAG	peroxiredoxin
PGE-2	prostaglandinu E2
TLR4	receptor podobný Toll 4 (z angl. "Toll-like receptor 4")
TNF	faktor nádorové nekrosy (z angl. "tumor necrosis factor")
TRX	thioredoxin
VCAM	vaskulární buněčné adhezní molekuly
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor

2 Úvod

Nádorová onemocnění vznikají jako důsledek náhodných změn genetické informace, individuálních vlastností organismu a/nebo jako důsledek působení karcinogenních faktorů ze způsobu života a pracovního prostředí [1]. Přibližně jedna třetina úmrtí pacientů s nádorovým onemocněním souvisí s životními a stravovacími návyky, jako je vysoká tělesná hmotnost, nízká konzumace ovoce a zeleniny, nedostatek fyzické aktivity, kouření a užívání alkoholu [2]. Mezi karcinogenní vlivy patří také biologické faktory, jako jsou například virová hepatitida B nebo infekce lidským papilomavirem [1]. S mikrobiálními infekcemi je spojováno přibližně 15 % případů výskytu rakoviny [3].

V České Republice jsou nádorová onemocnění hned po onemocněních kardiovaskulárního systému druhou nejčastější příčinou úmrtí. Zatímco úmrtnost spojenou s onemocněním srdce a cév se daří snižovat, úmrtnost spojená s nádorovými onemocněními klesá jen velmi zvolna [1]. Ročně umírá na nádorová onemocnění více než 27 tisíc Čechů, což představuje 23 % z celkového počtu úmrtí v ČR [4]. Také celosvětově patří rakovina mezi nejrozšířenější onemocnění s přibližně čtrnácti miliony nových případů a osmi miliony úmrtí ročně (údaje z roku 2012). V příštích dvou desetiletích se očekává nárůst incidence nádorových onemocnění až o 70 %. [2].

Epidemiologické studie ukazují, že pacienti trpící chronickým zánětlivým onemocněním mají zvýšené riziko výskytu nádorového bujení [3]. Zajímavým zjištěním bylo, že uvnitř nádorových tkání se vyskytuje neobvykle vysoká koncentrace prozánětlivého cytokinu inhibičního faktoru migrace makrofágů (MIF), který je přímo schopen podporovat růst nádoru a jeho prospívání [5].

Inhibiční faktor migrace makrofágů byl poprvé popsán v roce 1966 jako molekula inhibující náhodnou migraci makrofágů a díky této vlastnosti také získal svůj název [6, 7], jedná se o vůbec první cytokin, který byl kdy popsán [8].

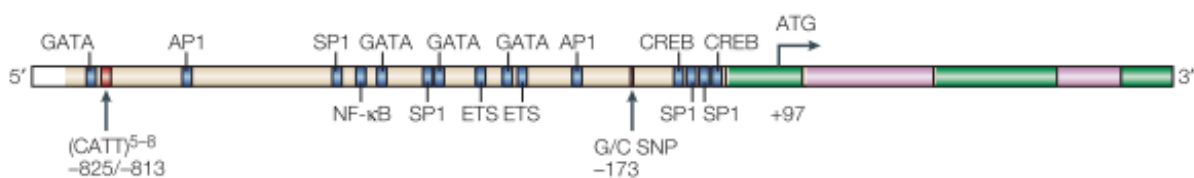
3 Cíl práce

Cílem předkládané bakalářské práce je shrnutí současných poznatků o inhibičním faktoru migrace makrofágů (MIF) se zaměřením na jeho úlohu v rámci imunitního systému a jeho roli u vzniku a vývoje nádorových onemocnění.

4 Přehled literatury

4.1 Gen kódující MIF a primární struktura molekuly

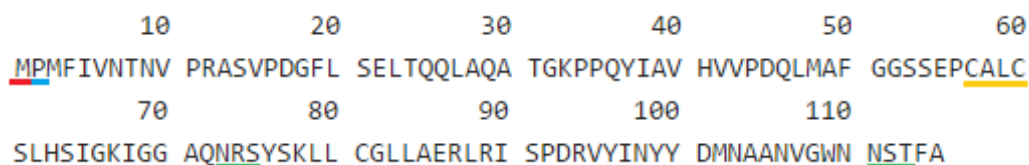
O genu kódujícím inhibiční faktor migrace makrofágů je známo, že se skládá z méně než 1000 párů bazí (bp) a obsahuje tři exony oddělené dvěma introny (viz Obr. 1) o velikosti přibližně 100 – 200 bp [9]. Lidský genom obsahuje pouze jeden gen kódující MIF, který je lokalizován na chromozomu 22 (22q11.2). Naproti tomu, v myším genomu bylo nalezeno minimálně devět pseudogenů MIF umístěných na chromozomu 10. Inhibiční faktory migrace makrofágů izolované z různých savců vykazují přibližně 90% sekvenční podobnost, homologní molekuly však byly nalezeny i v organismech kuřat, ryb, klíšťat, rostlin a cyanobakterií [10].



Obr. 1 Gen kódující lidský MIF. Exony jsou vyznačeny zeleně, šipky označují místa významných polymorfismů.

(převzato a upraveno z [10])

Analýza komplementární DNA ukázala, že molekula MIF je v genomu kódována jako protein sestávající ze 115 aminokyselin (viz Obr. 2), posttranslačním odštěpením methioninu pak vznikne produkt o délce 114 aminokyselin¹ a molekulové hmotnosti 12,5 kDa [9].



Obr. 2 Aminokyselinová sekvence MIF. Červeně je značen methionin, který je posttranslačně odštěpen, modře je značen prolin na pozici dva zodpovědný za tautomerasovou aktivitu MIF, žlutě je značen úsek CALC podílející se na oxidoreduktasové funkci MIF, zeleně jsou značeny úseky NXS/T vhodné pro N-glykosylaci (převzato a upraveno z [11])

¹ Ačkoliv se ve finální molekule MIF nachází 114 aminokyselin, mnoho dostupných materiálů vychází při popisu aktivních míst molekuly ze stavu před odštěpením methioninu a tedy celkového počtu 115 aminokyselin. Vzhledem k tomu, že popis pomocí celkového počtu 115 aminokyselin se vyskytuje častěji, je tento systém použit i v této práci a veškeré informace byly přizpůsobeny.

Protein MIF neobsahuje N-terminální ani jinou známou signální sekvenci, která by umožňovala jeho transport do endoplazmatického retikula [12]. Produkce MIF tak probíhá pomocí specializovaných intracelulárních drah bez účasti endoplazmatického retikula nebo Golgiho aparátu [13, 14]. Hmotnostní spektrometrie inhibičního faktoru migrace makrofágů izolovaného z myších jater ukázala, že ačkoliv aminokyselinová sekvence tohoto proteinu obsahuje dva úseky vhodné pro N-glykosylaci, tento protein nijak posttranslačně glykosylován není [9].

Porovnáním sekvence aminokyselin MIF se známými proteiny byla nalezena sekvencí podobnost s enzymem D-dopachrom tautomerasou (DDT) [15]. Myší MIF je s D-dopachrom tautomerasou homologní z 27 %, s lidským MIF je tato podobnost dokonce 34 % [13]. Vzhledem k tomu, že v lidské DNA jsou geny pro tyto proteiny umístěny blízko sebe na chromozomu 22, dalo by se spekulovat, že se oba tyto geny vyvinuly z jednoho společného předka a přizpůsobily se odlišným biologickým funkcím [10].

Inhibiční faktor migrace makrofágů se v lidské populaci přirozeně vyskytuje ve více variacích [10]. Tento jev se nazývá genový polymorfismus. Nejčastějším typem polymorfismu je odlišnost v jednom nukleotidu, ale může se jednat i o úsek výrazně delší [16]. Dva z polymorfismů promotorového úseku lidského genu pro MIF se podařilo spojit s výskytem onemocnění u člověka. Jedním z nich je záměna jediného nukleotidu (změna G na C na pozici 173), která je spojována se vznikem juvenilní artritidy. Druhým polymorfismem genu MIF je opakování čtyř nukleotidů CATT na pozici 794, která koreluje se závažností onemocnění u pacientů s revmatoidní artritidou [10]. Úsek CATT se vyskytuje v pěti až osmi opakováních a byla objevena přímá souvislost mezi počtem kopií CATT sekvence a mírou exprese MIF. Jedinci s alelou CATT₅ vykazovali nižší expresi MIF než jedinci se šesti až osmi kopiemi této sekvence genu [17]. Další studie rozšířily souvislost mezi počtem opakování CATT sekvence a závažností autoimunitních zánětlivých onemocnění také na astma, ulcerózní kolitidu, lupénku a roztroušenou sklerózu [3].

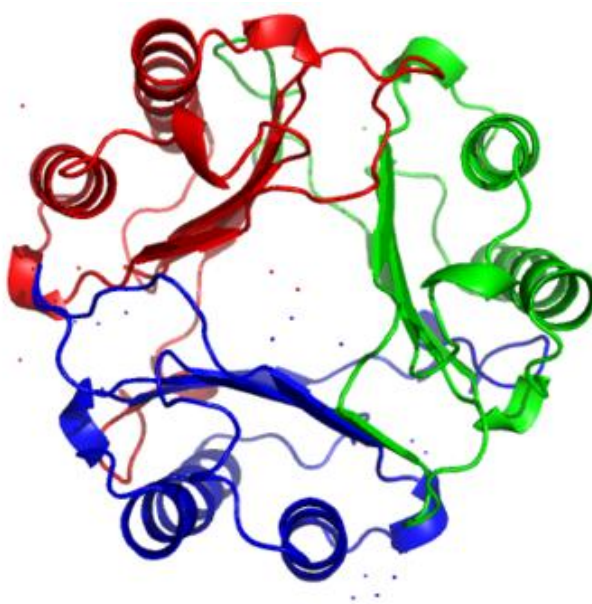
Výskyt jednotlivých alel není v populaci rovnoměrný, např. v Subsaharské Africe se vyskytuje převážně alela CATT₅. Některé hypotézy navrhují, že tato alela s nízkou expresí MIF poskytuje jedincům ochranu před zánětlivými komplikacemi

při onemocnění malárií. Pokusy na modelových organismech tuto domněnku potvrzují [3].

4.2 Krystalografické stanovení struktury MIF

Strukturu inhibičního faktoru migrace makrofágů se poprvé podařilo popsat v roce 1996 pomocí rentgenostrukturní analýzy. Tato analýza byla provedena s rekombinantním lidským MIF, který byl izolován z *E. coli* za redukčních podmínek a získaná data proto nemusí zcela odpovídat struktuře MIF *in vivo*. Stanovit strukturu MIF v oxidovaném stavu se zatím nepodařilo, tato forma totiž není při vysokých koncentracích a podmínkách potřebných pro rentgenostrukturní analýzu rozpustná [18].

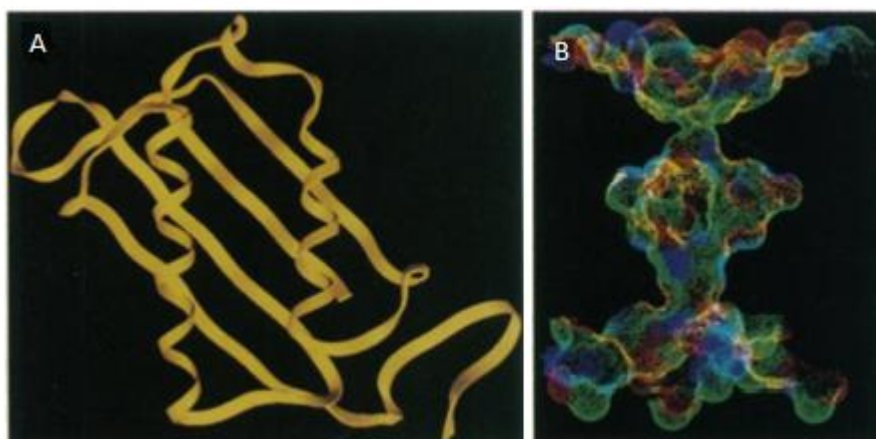
Inhibiční faktor migrace makrofágů se vyskytuje ve formě homologního trimeru [19] o přibližných rozměrech $35 \times 50 \times 50$ Å [9, 15]. Tento trimer je tvořen šesti α -helixy uspořádanými kolem tří centrálních β -struktur, které se stáčíjí a vytvářejí kanál vedoucí středem molekuly (viz Obr. 3). Každá z podjednotek obsahuje dva antiparalelní α -helixy a jednu β -strukturu složenou ze čtyř vláken (viz Obr. 4A, str. 14), dále se zde vyskytují dva doplňkové β -listy, které interagují s β -listy sousedních podjednotek a vytvářejí spoje mezi jednotlivými monomery [15]. Podle rentgenostrukturní analýzy má sekundární struktura monomeru motiv $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta\beta$, přičemž části $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 4$ a $\beta 5$ tvoří centrální list [9].



Obr. 3 Struktura trimerní molekuly MIF. (převzato a upraveno z [11])

Stability trimery je dosaženo pomocí vodíkových můstků mezi monomery, spojením jednotlivých β -listů a dále propojením mezi α -helixy a C-terminálním koncem. Za podmínek rentgenostrukturní analýzy jsou všechny tři cysteiny, které molekula MIF obsahuje, přítomny ve formě thiolů a tvoří disulfidické můstky [12].

Pravděpodobně nejvíce neobvyklým rysem struktury MIF je přítomnost kanálu, který prochází středem celého proteinu a zároveň se shoduje s trojčetnou osou symetrie. Šíře kanálu v jeho užším místě je 3-4 Å a v jeho nejširším místě okolo 15 Å [12]. Kanál má ojedinělý tvar, který by bylo možné popsat jako dvě velké nálevky ústící do středu proteinu (viz Obr. 4B) a je lemován převážně hydrofilními skupinami, které umožňují přístup molekul vody do tohoto kanálu [15]. Mapa elektrostatického potenciálu molekuly MIF ukazuje, že se v oblasti kanálu vyskytuje pozitivní potenciál a mohl by tedy sloužit k interakci s negativně nabitými částicemi [12].



Obr. 4 Detail struktury MIF. (A) Struktura monomeru MIF obsahující 2 antiparalelní α -helixy a centrální β -list složený ze 4 β -struktur. (B) Kanál procházející molekulou MIF. (převzato a upraveno z [15])

Mnoho proteinů obsahuje ve své struktuře dutiny nebo krátké kanálky, ale jen málo proteinových kanálů prochází celou molekulou. Proteiny, v jejichž struktuře se vyskytuje kanál, jsou např. groEL, β -podjednotka DNA-polymerasy III, porin, maltoporin nebo 14-3-3 protein. Tou nejzřejmější rolí proteinových kanálů je umožnění průchodu iontů a molekul proteinem. U MIF zatím aktivita zahrnující průchod molekul proteinovým kanálem prokázána nebyla, MIF se však účastní mnoha reakcí a musí být ještě určeno, zda se některá z interagujících molekul váže na MIF v oblasti kanálu, např. D-dopachrom nebo glutathion. Obě z těchto látek však obsahují

záporně nabitě skupiny, které by mohly být stabilizovány vlivem pozitivního potenciálu kanálu [15].

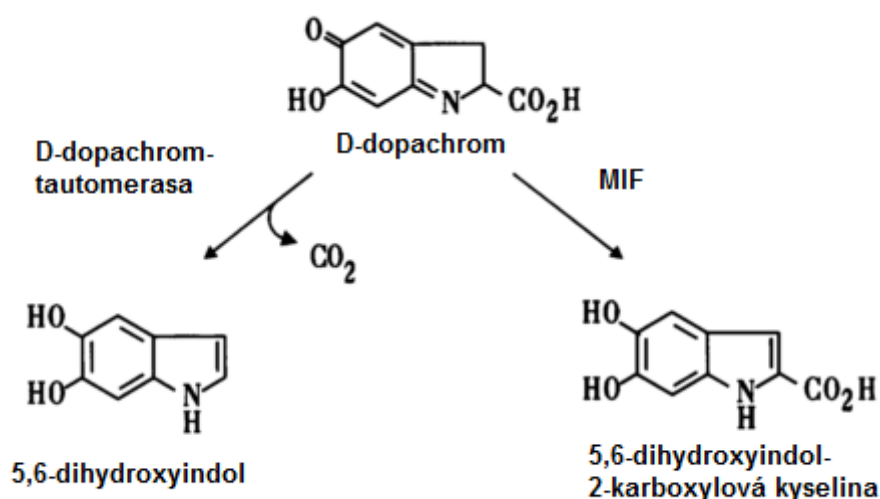
Struktura MIF vykazuje nápadnou homologii s třídimenzionální strukturou bakteriálních enzymů 4-oxokrotonát tautomerasy (4-OT) a 5-karboxymethyl-2-hydroxymukonát isomerasy (CHMI), 4-OT je organizována jako hexamer, CHMI jako trimer, nebyla zde však pozorována žádná podobnost sekvenční [12].

4.3 Enzymatická funkce inhibičního faktoru migrace makrofágů

Ačkoliv byl MIF poprvé popsán jako molekula inhibující náhodnou migraci makrofágů, následné studium této molekuly prokázalo, že je schopen také enzymatického působení [20].

4.3.1 Tautomerasová aktivita MIF

Bakteriální enzymy, strukturně homologní s MIF, 4-OT a CHMI se jako katabolické enzymy podílí na degradaci aromatických sloučenin a katalyzují izomerační reakce. Studie ukázaly, že katalyticky aktivní částí molekul je N-koncový prolin [21]. Také MIF se projevil jako možný katalyzátor tautomerizační reakce, konkrétně při konverzi, ve fyziologických podmínkách se nevyskytujícího, D-isomeru dopachromu (2-karboxy-2,3-dihydroindol-5,6-chinon) na 5,6-dihydroxyindol-2-karboxylovou kyselinu (DHICA) (viz Obr. 5) [21, 22].



Obr. 5 Schéma konverze D-dopachromu katalyzované D-dopachrom-tautomerasou a MIF.

(Převzato a upraveno z [22])

Ačkoliv 4-OT a CHMI nevykazují žádnou výraznou sekvenční podobnost s MIF, ve dvou znacích důležitých pro enzymatickou aktivitu se shodují – v podobné terciární/kvartérní struktuře proteinů a v přítomnosti katalytického N-terminálního prolinu, který je vždy lokalizován na dně hydrofobní dutiny. Rozdíly v aminokyselinovém složení hydrofobních dutin jednotlivých proteinů mohou být důsledkem přizpůsobení se vstupu a orientaci odlišného substrátu [21].

Do mnoha biochemických a buněčných regulačních procesů jsou zahrnuty lipidy a mastné kyseliny (např. kyselina arachidonová). O mastných kyselinách je také známo, že jsou schopné ovlivňovat intracelulární signalizaci a proteolytickou aktivitu, čímž zasahují do interakcí mezi receptory a jejich ligandy a modulují tak jejich činnost [21, 23]. Mastné kyseliny se navíc ukázaly jako důležité modulátory enzymatické aktivity, jsou totiž schopné potencovat allosterickou inhibici regulačních efektorů [21, 24]. Bylo sledováno, že také mezi MIF a různými mastnými kyselinami dochází k reverzibilní interakci, která se odráží ve ztrátě tautomerasové aktivity, přičemž tato ztráta aktivity je přímo úměrná koncentraci mastných kyselin. Tato vysoká efektivita ve spojení s reverzibilitou napovídá, že mastné kyseliny nebo podobné sloučeniny by mohly hrát roli v regulaci aktivity MIF *in vivo*. Jako příklad mohou sloužit fosfolipasy, které se účastní kaskády vedoucí k zánětlivé reakci organismu a během tohoto děje uvolňují mastné kyseliny [21].

Enzymatická přeměna dopachromu na 5,6-dihydroxyindol-2-karboxylovou kyselinu se v organismu objevuje během pozdní fáze biosyntesy melaninu. Tuto tautomerizaci katalyzují dva enzymy melanocytů, které jsou specifické pro přirozeně se vyskytující L-isomer dopachromu. Během studií kmenů melanomových buněk byla však náhodou rozpoznána konverze D-dopachromu na 5,6-dihydroxyindol (DHI) poté, co byl tento nefyziologický D-isomer dopachromu přidán jako kontrolní substrát. Následné zkoumání vedlo k izolaci enzymu D-dopachrom tautomerasy, která katalyzuje právě přeměnu D-dopachromu na DHI pomocí tautomerizační a dekarboxylační reakce. Vysoký výskyt D-dopachrom tautomerasové aktivity vykazují buňky jater, které jsou zároveň známé jako hojný zdroj MIF. Je zajímavé, že ačkoliv MIF vykazuje určitou strukturní podobnost s DDT, ani jeden z těchto dvou enzymů nesdílí podobnost s enzymy melanocytů, které konvertují L-dopachrom na 5,6-dihydroxyindol-2-karboxylovou kyselinu [22].

MIF je schopen katalyzovat tautomerizaci nejen samotného D-dopachromu, ale také mnoha jeho derivátů s karboxylovou skupinou modifikovanou na ester, thioester nebo amid [21]. MIF je sice méně aktivní v katalyzování tautomerizace D-dopachromu než DDT, ale při katalyzování přeměny D-dopachrommethylesteru je MIF naopak efektivnější [22].

Fyziologickým substrátem inhibičního faktoru migrace makrofágů by také mohly být určité peptidy nesoucí N-terminální tyrosin. N-terminální tyrosin se vyskytuje v mnoha biologicky aktivních neuropeptidech, které vykazují jak neuroendokrinní, tak imunologickou aktivitu. Enzymy tyrosinkinasy jsou navíc známé svou schopností konvertovat peptidy obsahující N-terminální tyrosin v odpovídající dopachrom-peptidy. Vzhledem k rozšířené expresi inhibičního faktoru migrace makrofágů v centrální nervové soustavě je možné, že MIF přeměňuje dopachrom-peptidy na jejich DHICA homology a potenciálně moduluje jejich bioaktivitu [21].

Není zcela neobvyklé, že cytokiny mají enzymatickou aktivitu, tato vlastnost byla pozorována i u zralých leukemických T-buněk (z angl. "adult T-cell leukemia-derived factor") nebo u cyklofilinu [25], který je schopen intracelulárně působit jako peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa a zároveň je na něj cíleno významné imunosupresivní léčivo cyklosporin [22].

Inhibiční faktor migrace makrofágů se také uplatňuje jako fenylypyruvát-tautomerasa s p-hydroxyfenylpyruvátem a fenylypyruvátem jako přirozenými substráty. Tautomerizační přeměny těchto substrátů byly popsány ve studiích týkajících se degradace fenylalaninu a tyrosinu dříve, než byl MIF vůbec objeven, ale enzym katalyzující tuto reakci se dlouho nedařilo izolovat a sekvenovat. Až později bylo zjištěno, že se jedná o identické proteiny. Tato tautomerizační aktivita také odpovídá vlastnostem homologních bakteriálních enzymů 4-OT a CHMI, které jsou zahrnuty v katabolismu produktů vzniklých štěpením aromatických kruhů a katalyzují tautomerizaci těchto produktů na intermediáty citrátového cyklu [26].

4.3.2 Oxidoreduktasová aktivita MIF

Druhou enzymatickou aktivitou MIF je jeho oxidoreduktasové působení na thiolové proteiny [18, 25]. Bylo objeveno, že inhibiční faktor migrace makrofágů katalyzuje redukci disulfidických můstků v molekule inzulinu a také v molekule 2-hydroxyethyl-disulfidu [25]. Toto oxidoreduktasové působení MIF je umožněno CALC motivem v primární struktuře molekuly (viz Obr. 2, str. 11), důležité jsou hlavně cysteiny v polohách 57 a 60. Mutantní molekuly MIF, ve kterých došlo ke změně CALC motivu, zároveň ztratily i svou schopnost ovlivňovat makrofágy [18].

Studie prokázaly, že v MIF dochází za určitých okolností k tvorbě intramolekulárního disulfidického můstku, který není důležitý ani tak pro udržení struktury molekuly jako pro její funkci. Přítomnost tohoto můstku nebyla odhalena pomocí krystalografických studií lidského a myšího MIF, neboť tyto studie byly provedeny s rekombinantním MIF z *E. coli*, který byl izolován v redukčních podmínkách [18].

Katalytická centra enzymů, které způsobují oxidoredukční změny thiolových proteinů, jsou často obsaženy v thiol/disulfidových segmentech daných enzymů, které vykazují charakteristický motiv CXXC. Nicméně mnoho proteinů obsahujících sekvence CXXC však tuto aktivitu nevykazuje. Průměrné peptidy obsahující sekvenci CXXC mají nízkou tendenci k tvorbě disulfidických můstků (15 %), MIF však v oxidované formě tuto vazbu silně upřednostňuje a k tvorbě disulfidického můstku dochází ve více než 90 % případů [18].

MIF vykazuje určitou podobnost s dalším hypofyzárním hormonem majícím oxidoreduktasovou aktivitu pro thiolové proteiny, konkrétně lutropinem. Lutropin stejně jako MIF nevykazuje žádnou strukturní podobnost s oxidoreduktasami rodiny Trx, což jsou neobvyklé cytokiny s doplňkovou enzymatickou aktivitou [18, 27].

Bylo objeveno, že renaturovaný MIF obsahuje jak oxidovanou, tak redukovanou formu proteinů, což naznačuje, že ve fyziologických podmínkách by mezi těmito dvěma formami mohla existovat určitá rovnováha. Dále bylo prokázáno, že oxidovaná forma MIF je díky disulfidickým můstkům stabilnější. Navíc je MIF schopen oxidoreduktasové aktivity i v tak nízkých koncentracích, v jakých se vyskytuje v organismu [18]. Koncentrace MIF v plazmě zdravého člověka fluktuuje v rozmezí 2-6 ng/ml [28].

4.4 Chaperonová aktivita inhibičního faktoru migrace makrofágů

Chaperony jsou molekuly schopné vázat proteiny nacházející se v jiné, než ve své nativní konformaci a chránit je před interakcemi se sebou samými nebo s okolními proteiny, které by mohly vést k poškození nebo ke vzniku neproduktivní konformace. V tomto stavu se proteiny mohou nacházet například po vystavení vnějšímu stresu, mutacích nebo třeba při kotranslačním skládání nově syntetizovaného polypeptidového řetězce [29].

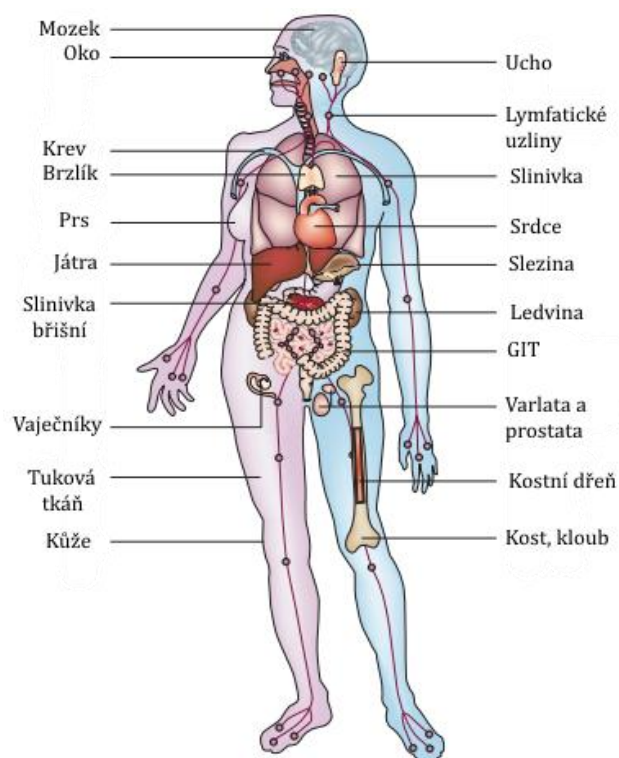
Vzhledem k tomu, že je inhibiční faktor migrace makrofágů vysoce hydrofobní a stabilní protein, byla navržena teorie, že by mohl patřit mezi molekulární chaperony. Ve studiích *in vitro* bylo skutečně dokázáno, že MIF je schopen bránit agregaci proteinů vlivem zvýšené teploty, tento efekt byl pozorován na proteinech malátdehydrogenase izolované z prasečího srdce a glykogenfosforylase b izolované z králíčího kosterního svalu [29].

4.5 Lokalizace MIF v lidském organismu

V době, kdy byl inhibiční faktor migrace makrofágů poprvé popsán, se předpokládalo, že se jedná o látku produkovanou pouze T-lymfocyty, která slouží k ovlivňování makrofágů. Později však bylo zjištěno, že MIF je exprimován také v mnoha dalších tkáních, mimo jiné ho produkují samotné makrofágy, další leukocyty a také většina epitelálních buněk. Množství a různorodost tkání produkujících MIF (viz Obr. 6 a Tab. 1, str. 21) však naznačuje, že MIF nehraje roli zdaleka jen v rámci imunitního systému, ale má také další fyziologické funkce [5].

Vzhledem k tomu, že buňky exprimují MIF konstitutivně, dochází ke vzniku intracelulárních zásob tohoto proteinu a v případě potřeby nemusí být syntetizován *de novo* [20]. Uvolnění jiných cytokinů, např. faktoru nádorové nekrosy alfa (TNF- α), interleukinu-1 β (IL-1 β) nebo interleukinu-8 (IL-8), oproti tomu následuje až po určité prodlevě potřebné k jejich transkripci a translaci [8]. Po uvolnění intracelulárně uchovávaného MIF dojde k následnému zvýšení jeho exprese a doplnění intracelulární zásoby [14].

Během syntézy MIF neprochází endoplazmatickým retikulem, ani nepodléhá žádné posttranslační modifikaci v Golgiho aparátu. Jako vazebný partner molekuly MIF byl identifikován protein p115 asociovaný s Golgiho aparátem. Imunofluorescenční mikroskopická studie ukazuje, že intracelulární zásoba MIF po stimulaci disperguje směrem k periferiím a stejným způsobem je po stimulaci lipopolysacharidy (LPS) distribuován z Golgiho aparátu směrem k plazmatické membráně také protein p115. Je však možné, že stimulace lipopolysacharidy ovlivňuje další doplňkové zatím neznámé proteiny, které by mohly být potřebné pro interakci mezi MIF a p115 a následný export MIF ven z buňky. Otázkou zůstává, zda se p115 účastní jen exportu MIF, nebo zda zprostředkovává generalizovanou sekreční odpověď aktivovaných makrofágů, která vede k uvolnění makromolekulárního komplexu p115, který obsahuje četné proteiny, z nichž jedním je MIF [14].



Obr. 6 Distribuce MIF v tkáních lidského těla. (převzato a upraveno [10])

Tab. 1 Buňky a tkáně lidského těla produkující MIF. (převzato a upraveno [10])

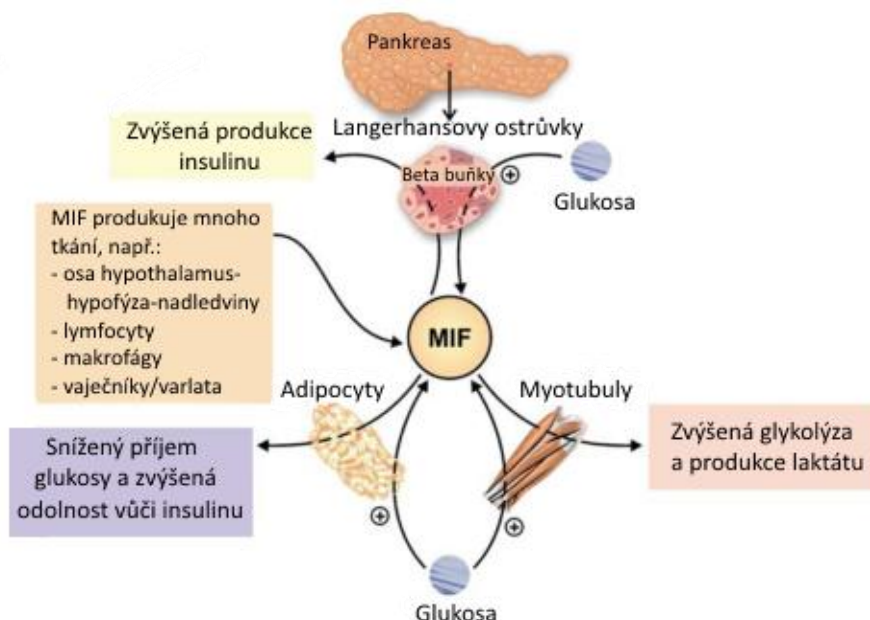
mozek	kůra mozková, hypothalamus, mozeček, hipokampus, Varolův most, gliové buňky, astrocyty
oko	čočka, epitelální buňky rohovky, duhovka, řasnaté tělísko, buňky endotelu, buňky sítnice včetně epitelálních, Müllerovy buňky, astrocyty
ucho	při zánětu středního ucha
imunitní systém	brzlík, slezina, lymfatické uzliny, krev, kostní dřeň, monocyty/makrofágy, T-lymfocyty, B-lymfocyty, dendritické buňky, eozinofily, bazofily, neutrofil, žírné buňky
plíce	makrofágy a epitelální buňky
srdce a cévy	endotelální buňky
endokrinní systém	hypofýza, kůra nadledvin, β -buňky pankreatu
játra	Kupfferovy buňky, hepatocyty, endotelální buňky
varlata, prostata a vaječníky	Leydigovy buňky, epitelální a granulózní buňky folikulů
GIT	epitelální buňky jícnu, žaludku, tenkého a tlustého střeva, neurony
ledviny	epitelální a endotelální buňky, mesangiální buňky
tuková tkáň	adipocyty
kůže	keratinocyty, mazové žlázy, vlasové folikuly, endotelální buňky, fibroblasty
kosti a klouby	osteoblasty, fibroblasty, synoviocyty

4.6 Hormonální funkce inhibičního faktoru migrace makrofágů

Inhibiční faktor migrace makrofágů není jen významným cytokinem imunitního systému, ale může se chovat také jako hormon. Jedním z příkladů hormonálního působení je jeho sekrece společně s insulinem po stimulaci glukosou, během které MIF podporuje sekreci insulinu. Druhou možností je sekrece MIF z adenohypofýzy společně s kortisolem, v tomto případě se MIF uplatňuje jako negativní regulátor imunosupresivního účinku glukokortikoidů [20].

4.6.1 Vliv MIF na metabolismus glukosy

Inhibiční faktor migrace makrofágů je schopen zasahovat do metabolismu glukosy na několika úrovních (viz Obr. 7), ovlivňuje totiž jak produkci insulinu v pankreatických β -buňkách, tak cílové buňky insulinem ovlivňované [30]. V β -buňkách je MIF lokalizován spolu s insulinem v sekrečních granulích, kde spolu tyto molekuly interagují. MIF napomáhá využití plné bioaktivity insulinu, čehož je pravděpodobně dosaženo změnou konformace molekuly insulinu [20]. Exprese MIF uvnitř buněk a jeho koncentrace v krevní plazmě se řídí cirkadiálními rytmy, produkce MIF je však ovlivňována mimo jiné i koncentrací glukosy v krvi [30].

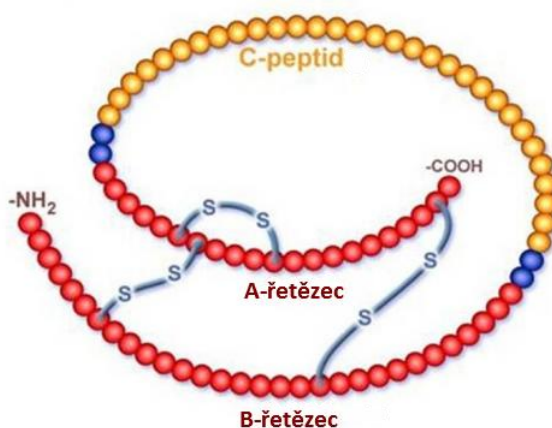


Obr. 7 Schéma popsaného vlivu MIF na regulaci hladiny glukosy v krvi (převzato a upraveno z [30])

Jakmile je inhibiční faktor migrace makrofágů sekretován z buňky, dojde k pozitivnímu ovlivnění sekrece insulinu β -bunškami pankreatu, což vede ke snížení hladiny glukosy v krvi. Kromě pankreatických β -buněk produkují MIF i buňky, které podléhají účinkům insulinu, včetně myocytů, kardiomyocytů a adipocytů. Tyto buňky produkují MIF jak konstitutivně, tak v odpovědi na vnější stimuly (např. $\text{TNF-}\alpha$). Míra produkce MIF v adipocytech závisí navíc na umístění daných buněk v rámci organismu, například adipocyty v podkoží produkují přibližně desetkrát více MIF než adipocyty v okolí mléčné žlázy [30].

Ve svalových buňkách MIF indukuje zvýšený příjem glukosy a následnou glykolýzu, čemuž odpovídá zvýšená hladina enzymu 6-fosfofrukto-2-kinasy, která souvisí s umocněním syntesy fruktosy-2,6-bisfosfátu. Fruktosa-2,6-bisfosfát je mocným pozitivním regulátorem glykolýzy a následné produkce laktátu [30].

Vzhledem k tomu, že absence MIF v organismu neinterferuje s procesem tvorby insulinu na translační nebo transkripční úrovni, uplatňuje se MIF nejspíše až na úrovni posttranslačních modifikací nebo hraje roli při finální maturaci insulinu v sekrečních váčcích. Při vzniku insulinu z proinsulinu (viz Obr. 8) jsou esenciální tři enzymy, jedná se o dvě endoproteasy, které z proinsulinu vyštěpí C-peptid a karboxypeptidasu E, která následně upraví konce řetězců. Přestože molekulová hmotnost nativního insulinu a insulinu získaného z MIF-deficitních myší je shodná, nemůže být vyloučeno, že se tyto dva typy insulinu liší v několika aminokyselinách. Tento fakt by odpovídal vlivu MIF na karboxypeptidasu E [20].

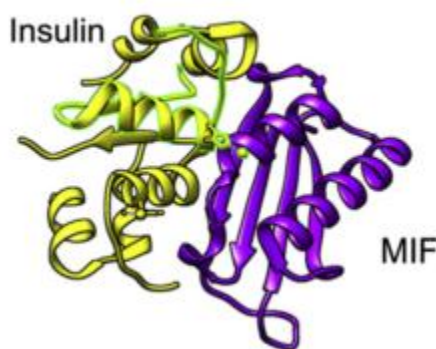


Obr. 8 Molekula proinsulinu. Při přeměně proinsulinu na insulin dochází k vyštěpení C-peptidu pomocí endoproteasy a následně k úpravě koncových částí řetězců (modré části molekuly) vlivem karboxypeptidasu E.

(Převzato a upraveno [31])

Vzhledem k tomu, že inhibice tautomerasové aktivity MIF nijak neinterferuje s jeho působením na insulin, mohl by se MIF na utváření insulinu podílet svou oxidoreduktasovou aktivitou, tato možnost však zatím nebyla potvrzena. Druhou možností je, že MIF asistuje při skládání insulinu jako chaperon. Nativní insulin a insulin izolovaný z MIF “knock-out“ myši vykazují odlišnou citlivost k proteolýze, což může být s velkou pravděpodobností způsobeno právě jejich odlišnou konformací [20].

Počítačové simulace ukázaly, že mezi MIF a insulinem existuje několik potenciálních vazebných míst (viz Obr. 9). Sekvence skutečného vazebného místa s nejnižší energií obou proteinů sice zatím nebyla identifikována, ale bylo dokázáno, že spolu tyto dva proteiny interagují také *in vitro*. Tato interakce sice nevede k pozměnění molekul insulinu, ale podporuje tvorbu hexamerních insulinových jednotek, které jsou důležité pro sbalení insulinu a zvýšení jeho stability. Výroba insulinu společně s MIF by tedy mohla zvýšit kvalitu a/nebo stabilitu insulinu a tím pádem pozitivně ovlivnit vlastnosti komerčně připravovaného insulinu. Tento proces však ještě musí být detailně prozkoumán [20].



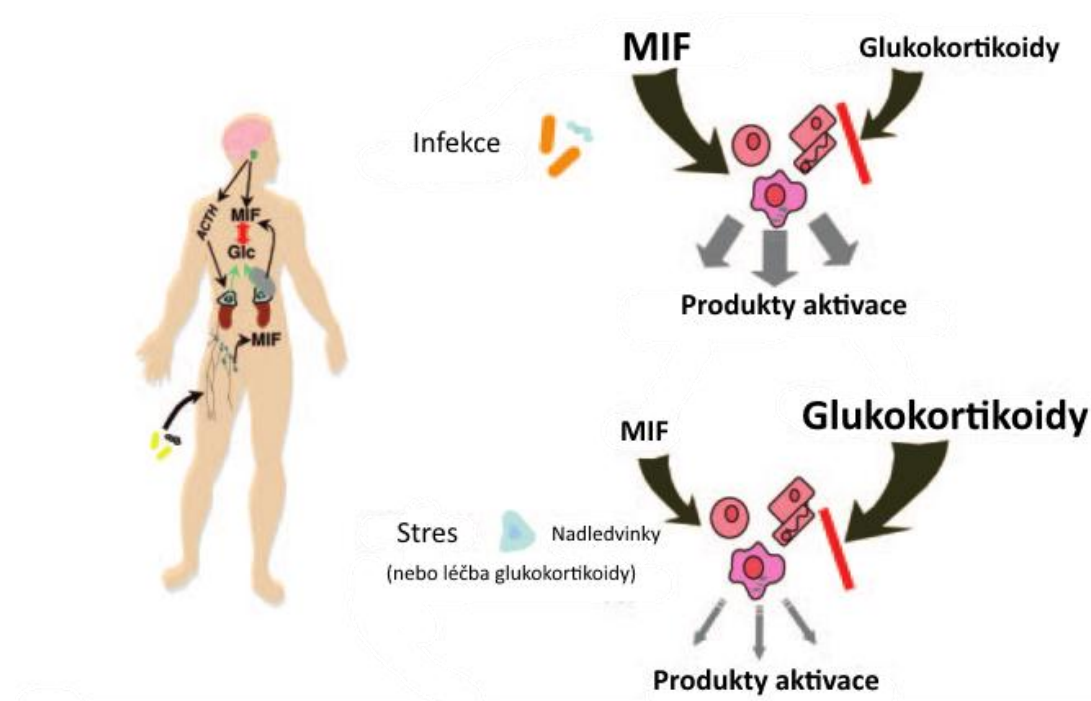
Obr. 9 Teoretická interakce mezi molekulami insulinu a MIF (převzato a upraveno z [20])

Inhibiční faktor migrace makrofágů je nezbytným mediátorem inhibice přenosu signálu z insulinového receptoru vedoucí k rezistenci na insulin. Tento efekt souvisí s redukovanou fosforylací proteinkinasy Akt, která je společně s fosfatidylinositol-3-kinasou důležitá pro fosforylaci IRS-1, což je sekundární posel signalizace vycházející z insulinového receptoru a je tedy zapojen také do stimulace transkripce genů regulovaných insulinovým receptorem [30].

4.6.2 MIF jako negativní regulátor účinku glukokortikoidů

Glukokortikoidy jsou látky mající protizánětlivý a regulační účinek na obranu reakci organismu. Redukují produkci mnoha zánětlivých mediátorů včetně prozánětlivých cytokinů, prostaglandinů a reaktivních derivátů kyslíku a dusíku. Glukokortikoidy inhibují expresi adhezních molekul leukocytů, což vede k omezení migrace leukocytů do místa zánětu a také podporují jejich apoptosu, čímž limitují rozsah zánětlivé odpovědi. Ačkoliv se klinický efekt glukokortikoidů na vývoj onemocnění značně různí, jejich vliv na symptomy závažných zánětů je často odpovědný za záchranu života [32].

Počáteční zprávy o indukci produkce inhibičního faktoru migrace makrofágů právě pomocí glukokortikoidů byly překvapivé, neboť se jedná o extrémně neobvyklý způsob regulace prozánětlivého cytokinu [33]. Sekrece MIF indukovaná glukokortikoidy je velmi striktně regulovaná. Závislost množství vznikajícího MIF na koncentraci glukokortikoidů má tvar “zvonu”. Bylo pozorováno, že nižší fyziologické hladiny glukokortikoidů stimulují sekreci MIF z myších makrofágů, zatímco při vysokých protizánětlivých koncentracích glukokortikoidů je sekreci MIF bráněno (viz Obr. 10) [32].



Obr. 10 Vztah mezi MIF a glukokortikoidy v rámci regulace imunitní odpovědi. V případě infekce organismu nízké koncentrace glukokortikoidů podporují sekreci MIF. Vysoká koncentrace glukokortikoidů vyvolané např. stresem však sekreci MIF brání. (převzato a upraveno z [32])

Systém vzájemné regulace glukokortikoidů a MIF slouží ke kontrole imunosupresivního efektu glukokortikoidů, jejichž hladina může být zvýšená v rámci odpovědi na systémový stres organismu. MIF tak brání inhibici prozánětlivé a antimikrobiální odpovědi monocytů/makrofágů, která je pro organismus nezbytná.

Antagonistický efekt MIF na glukokortikoidy tak zajišťuje mechanismus, kterým si organismus uchovává funkční imunitní odpověď i během situací schopných vyvolat zvýšenou endogenní produkci glukokortikoidů, jako je zranění, stres nebo život ohrožující infekce [32].

Glukokortikoidy potlačují zvýšenou sekreci cytokinů z makrofágů, která je způsobená kontaktem s lipopolysacharidy a mají také antiproliferativní účinek na T-lymfocyty. Inhibiční faktor migrace makrofágů působí proti oběma těmto dějům a zároveň způsobuje prodlouženou aktivaci kinas regulovaných extracelulárním signálem (ERK, z angl. "extracellular signal-regulated kinase") a proteinkinas aktivovaných mitogenem p38 (MAP kinasa, z angl. "mitogen activated protein kinase"), která by mohla ústit v molekulární antagonismus glukokortikoidových receptorů. Žádné změny v expresi nebo afinitě těchto receptorů totiž nalezeny nebyly [33].

Glukokortikoidy indukují expresi proteinu GILZ (z angl. "glucocorticoid-induced leucine zipper"), který zprostředkovává mnoho důležitých protizánětlivých aktivit a inhibuje řadu intracelulárních signalizačních drah, včetně kinas umožňujících modulaci signalizační dráhy ERK. Inhibiční faktor migrace makrofágů a GILZ působí proti sobě a cílem současných studií je nalézt průsečík těchto regulačních drah [34].

4.7 Role inhibičního faktoru migrace makrofágů v imunitním systému

Inhibiční faktor migrace makrofágů a další cytokiny hrají zásadní roli v regulaci odpovědi organismu na záněty a napadení tkání. Regulují nespecifickou část obranné odpovědi organismu vytvořením lokálního zánětu a podílejí se na kontrole následné specifické imunitní odpovědi [9]. MIF po uvolnění moduluje expresi prozánětlivých mediátorů makrofágy a je důležitou součástí aktivace T-lymfocytů [35].

4.7.1 Molekulární mechanismus účinku MIF

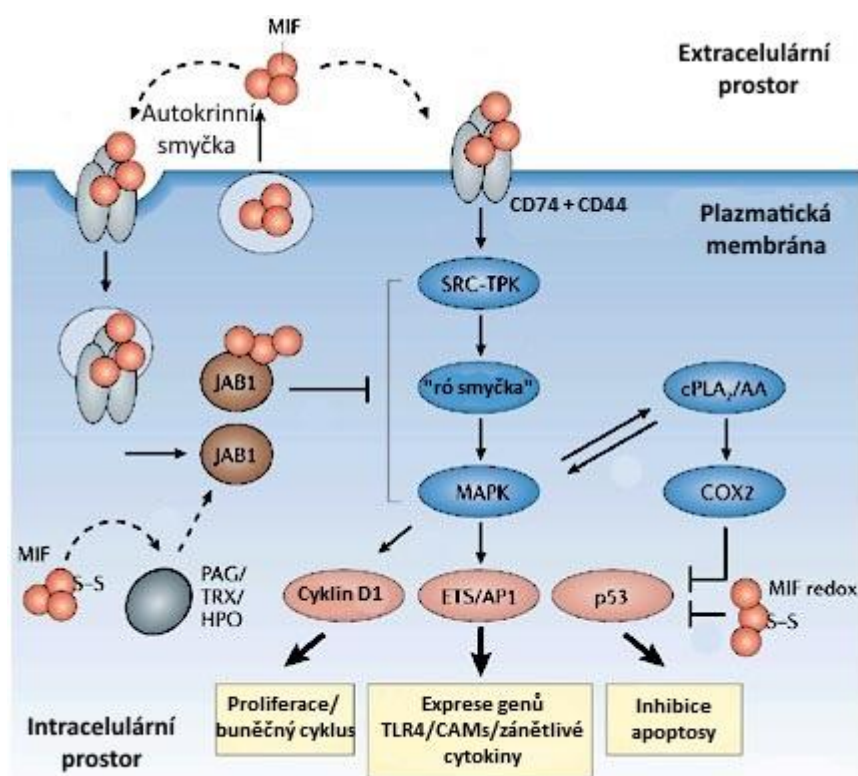
Jako receptor vázající molekuly inhibičního faktoru migrace makrofágů byl rozpoznán transmembránový protein II. typu označovaný jako CD74. CD74 se obvykle účastní transportu proteinů z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu, je však známo, že 2-5 % z celkového počtu molekul CD74 v buňce je umístěno na buněčném povrchu mnoha různých typů buněk [36]. CD74 se stejně jako MIF vyskytuje ve formě homotrimeru [37]. Zatímco CD74 zprostředkovává vazbu na inhibiční faktor migrace makrofágů, pro zahájení MIF-indukované fosforylace ERK1 a ERK2 je nezbytný transmembránový koreceptor CD44 [7]. Dále bylo prokázáno, že interakce MIF s těmito dvěma proteiny je esenciální pro ochranu buněk před apoptosou, proto v organismech bez CD74 nebo bez CD44 docházelo v místě zánětů ke zvýšené apoptose makrofágů [37].

Po interakci extracelulárního MIF s povrchovým receptorem dochází k aktivaci ERK 1 a ERK 2 a následně k aktivaci MAP kinasové dráhy (viz Obr. 11, str. 28). Mezi extracelulární inhibiční faktor migrace makrofágů zahrnujeme také MIF uvolněný z intracelulárních zásob v rámci autokrinní signalizace. Proces aktivace MAPK kaskády zahrnuje tyrosinkinasy skupiny SRC a také další mechanismy (např. tzv. "p-smyčka") [38].

Tyto procesy mohou způsobit aktivaci cyklinu D1 a následně ovlivňovat buněčný cyklus a proliferaci. Dalším efektem může být aktivace ETS domény, která obsahuje transkripční faktory rodiny ETS a transkripční faktory pro aktivační protein 1 (AP1), a následná exprese genů. Mezi takto exprimované geny patří např. buněčné adhezivní molekuly (CAM, z angl. "cell-adhesion molecule") nebo

receptor podobný Toll 4 (TLR4, z angl. "Toll-like receptor 4"). Třetím možným důsledkem aktivace MAP kinasové dráhy je aktivace p53-dependentní inhibice apoptosy pomocí MIF, která zahrnuje aktivaci cytosolické fosfolipasy A₂ (cPLA₂), vznik arachidonové kyseliny (AA) a aktivaci cyklooxygenasy 2 (COX2). Apoptosa indukovaná oxidativním stresem může být potlačena antioxidačními účinky MIF, které závisí na jeho intramolekulárním disulfidickém můstku. Kyselina arachidonová může naopak vést k expresi genů regulovaných pomocí MAP kinasové dráhy a AP1. Některé intracelulární proteiny interagují přímo s MIF, vysoké koncentrace endocytovaného MIF se váží na c-Jun aktivační doménu vázající protein 1 (JAB1) a negativně regulují signalizaci MIF pomocí MAP kinasové dráhy [38].

Intracelulární MIF pravděpodobně také reguluje další buněčné funkce pomocí enzymatické regulace s uplatněním peroxiredoxinu 1 (PAG), thioredoxinu (TRX) nebo hepatopoiétinu (HPO) [38].



Obr. 11 Molekulární mechanismy aktivované pomocí MIF. Vazba MIF na receptorový komplex CD74 a CD44 aktivuje MAP kinasovou dráhu, která umožňuje ovlivnit buněčný cyklus, proliferaci, inhibici apoptosy nebo expresi některých genů. Některé intracelulární proteiny interagují s MIF přímo. (převzato a upraveno z [39])

Byly také popsány interakce mezi MIF a receptory CXCR4 a CXCR2. Inhibiční faktor migrace makrofágů je schopen kompetovat s obvyklými ligandy těchto receptorů a zastavovat v zanícených arteriosklerotických arteriích buněčný cyklus monocytů v G1-fázi. K zastavení buněčného cyklu dochází pomocí interakce mezi CCR2 a CD74 tvorbou jejich komplexu, rychlé aktivace integrinů a přílivu vápenatých iontů [7].

4.7.2 Role MIF v rámci vrozené a získané imunity

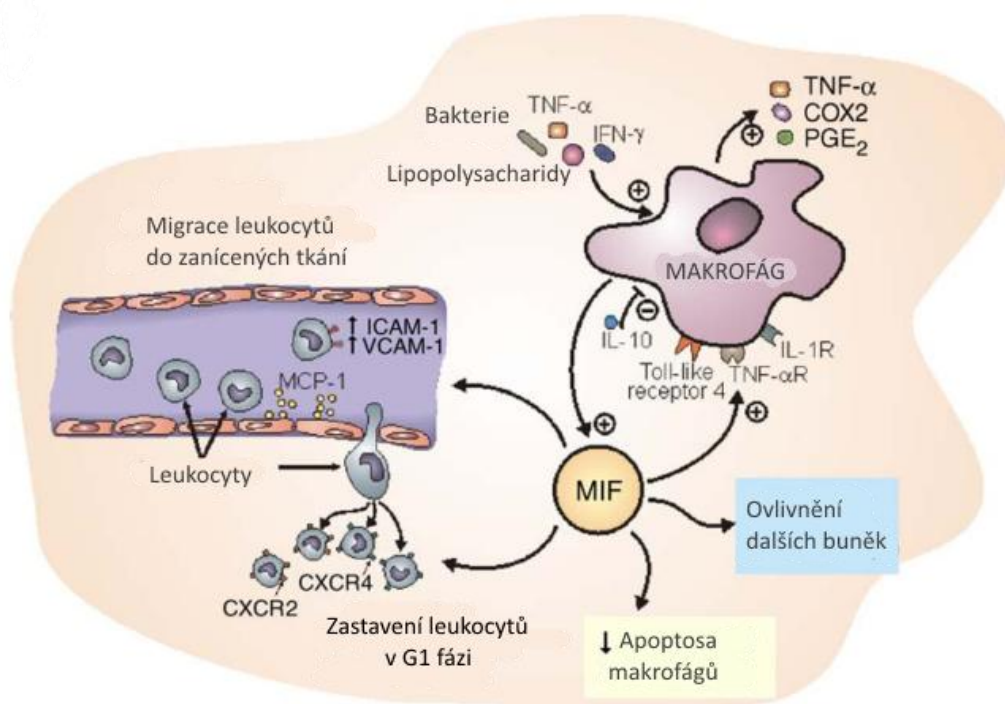
V rámci vrozené imunity se inhibiční faktor migrace makrofágů uplatňuje při reakci na endotoxiny a exotoxiny Gram-pozitivních i Gram-negativních bakterií a chová se jako typický prozánětlivý cytokin (viz Obr. 12, str. 30) [10]. Bakteriální toxiny a některé zánětlivé cytokiny včetně TNF- α a interferonu- γ (IFN- γ) zvyšují expresi MIF a jeho uvolnění z makrofágů, zatímco IL-10 jeho uvolnění inhibuje. MIF zesiluje zánětlivou reakci autokrinní i parakrinní aktivací makrofágů pomocí pozitivní zpětné vazby, a dále produkcí TNF- α , COX2 a prostaglandinu E₂. V okolních buňkách MIF také zvyšuje produkci TNF- α a receptorů pro IL-1, navíc podporuje produkci TLR4 na makrofázích. MIF zvyšuje expresi adhezních molekul ICAM-1 a VCAM-1, které zprostředkovávají přilnavost monocytů k endotelu cév poblíž místa zánětu. Inhibiční faktor migrace makrofágů je schopen se vázat na chemokinové receptory CXCR2 a CXCR4 a podporovat zastavení monocytů a lymfocytů v G1 fázi buněčného cyklu. Dále přispívá k migraci leukocytů z cév do místa zánětu tím, že podporuje endoteliální buňky v produkci chemoatraktantu monocytů (MCP-1, z angl. "monocyte chemotaxis protein 1"). MIF navíc zachovává imunitní odpověď tím, že inhibuje p53-zprostředkovanou apoptosu makrofágů [30].

Ačkoliv je MIF potřebný k potlačení bakteriální infekce, jeho vysoké koncentrace mohou v přítomnosti lipopolysacharidů vést k indukci septického šoku. Výzkumy prokázaly, že protilátky proti MIF jsou schopny výrazně zmenšit pravděpodobnost vzniku septického šoku a MIF-deficitní organismy jsou vůči toxickému šoku zcela rezistentní [10].

Během septického šoku vede nekontrolované uvolňování cytokinů mimo jiné k dysfunkci endoteliální bariéry a ke zvýšené propustnosti cév, která má za následek prosakování. Mezi cytokiny zodpovědnými za septický šok byl inhibiční faktor migrace makrofágů označen jako klíčový. Ačkoliv studie dokazují, že MIF je

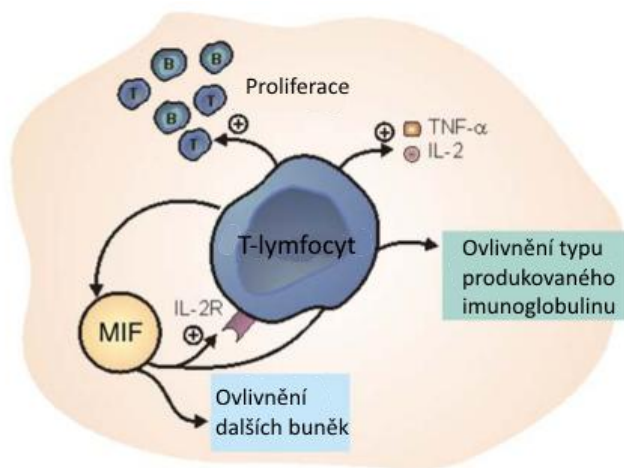
zahrnut v prosakování cév při horečce Dengue, přesnému mechanismu, kterým MIF porušuje bariéru, zatím nebylo porozuměno, pravděpodobně v něm však hraje klíčovou úlohu autofagie [40].

Studie prokázaly, že MIF deficitní makrofágy nebyly schopné vytvořit adekvátní odpověď na lipopolysacharidy a Gram-negativní bakterie, ale ne na další signály. Důvodem je redukováná produkce cytokinů díky snížené expresi TLR4, což je molekula přenášející signál LPS-receptorového komplexu. MIF zvyšuje expresi TLR4 působením na transkripční faktory důležité pro transkripci genu pro TLR4 [10].



Obr. 12 Úloha MIF v rámci vrozené imunitní odpovědi. (převzato a upraveno [30])

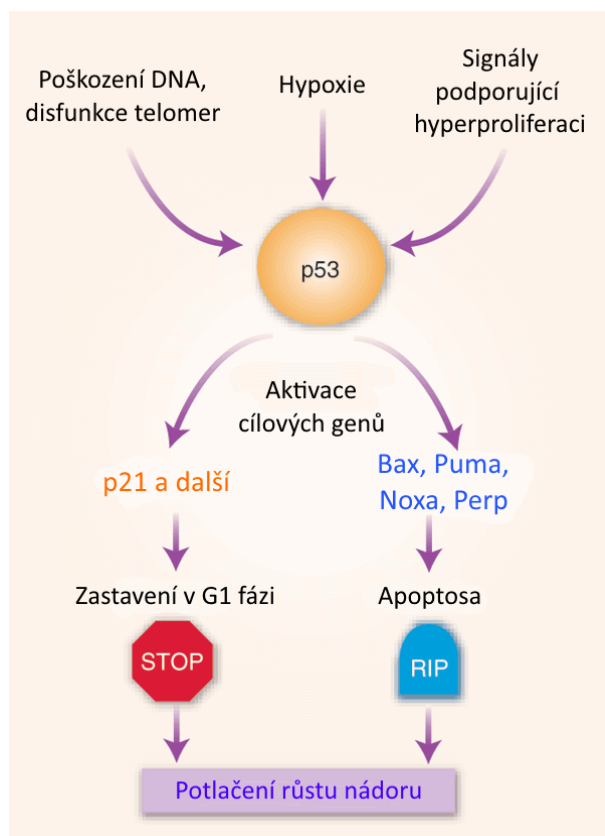
Ačkoliv byl MIF objeven jako faktor produkovaný T-lymfocyty, o jeho úloze v adaptivní imunitní odpovědi je zatím známo velmi málo (viz Obr. 13, str. 31) [10]. Podobně jako autokrinně ovlivňuje makrofágy v rámci vrozené imunity, ovlivňuje MIF také T-lymfocyty. Podporuje uvolnění IL-2 a TNF- α , expresi genu kódujícího receptor pro IL-2 a konečně také proliferaci T- a B-lymfocytů. MIF ovlivňuje rovnováhu mezi pomocnými T-buňkami typu Th1 a Th2 a pozměňuje typ imunoglobulinů produkovaných B-lymfocyty. Rozhodnutí mezi Th1 a Th2 odpovědí je však závislé na typu onemocnění. Není jasné, zda MIF moduluje sekreci imunoglobulinů přímo či nepřímo [30].



Obr. 13 Úloha MIF v rámci získané imunitní odpovědi (převzato a upraveno [30])

4.7.3 Inhibice aktivity p53

Protein p53 má zásadní roli v regulaci buněčného cyklu. Mezi jeho hlavní úlohy patří schopnost dočasně zastavit buněčný cyklus buňky tak, aby buňka zůstala „uvězněna“ v G1 fázi a nepokračovala v dělení. Další důležitou úlohou tohoto proteinu je indukce apoptosy buněk, jejichž DNA byla nevratně poškozena (viz Obr. 14). Buňky, které neodpovídají na stimulaci p53 odpovídajícím způsobem, nejsou schopné správně reagovat na poškození chromosomů, mohou se dělit i s poškozenou DNA a tak postupně hromadit potenciálně onkogenní mutace. Protein p53 se účastní také regulačních mechanismů buněčného stárnutí, které definují počet replikací a limitují počet buněčných cyklů, které je daná buňka ještě schopná provést. Není tedy překvapivé, že právě mutace v genu pro protein p53 patří mezi nejčastější změny lidské DNA, které se vyskytují v nádorových buňkách, neboť narušení regulace pomocí p53 prodlouží dobu života a přímo tak přispívá k nesmrtelnosti dané buňky [41].



Obr. 14 Schéma zásahu proteinu p53 do buněčného cyklu. V případě poškození buněčné DNA, nepříznivých podmínek nebo signálů podporujících nekontrolovanou proliferaci je MIF schopen zastavit buňku v G1 fázi nebo způsobit její apoptosu. (převzato a upraveno z [42])

Inhibiční faktor migrace makrofágů funguje jako negativní regulátor zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a apoptosy vyvolané vlivem proteinu p53, což poskytuje jedno z přímých spojení mezi MIF, záněty a tvorbou nádorů [10].

V místech zánětu je MIF sekretován především T-lymfocyty a makrofágy. Lokální vysoká koncentrace MIF totiž přispívá k aktivaci T-buněk a podporuje antimikrobiální aktivitu makrofágů. Aktivované makrofágy uvolňují látky toxické pro cizorodé buňky, hlavně molekuly oxidu dusného (NO) a vysoce reaktivní sloučeniny kyslíku. Oxid dusný je však schopen indukovat apoptosu nejen u cizorodých buněk, ale také u vlastních makrofágů. Proto je důležitá přítomnost MIF, který je schopen částečně negovat odpověď na stimulaci p53 a chránit tak makrofágy před apoptosou [41]. Programovaná buněčná smrt makrofágů bývá vyvolávána bakteriálními exotoxiny nebo endotoxiny, jako jsou například lipopolysacharidy. Makrofágy jsou také primárním místem produkce MIF po vystavení organismu těmto toxinům [35].

Inhibice účinku p53 vlivem inhibičního faktoru migrace makrofágů se shoduje s indukcí metabolismu kyseliny arachidonové a vznikem COX2, která je pro tuto regulaci nezbytná [35].

Tyto mechanismy byly potvrzeny při porovnání reakce běžných a MIF-deficitních makrofágů na stimulaci lipopolysacharidy. Oba typy buněk byly schopné produkovat srovnatelné množství NO, ale u MIF-deficitních buněk docházelo ve zvýšené míře k apoptose. Nedostatek MIF tedy snižuje životaschopnost a efektivitu prozánětlivé reakce makrofágů [10].

Místa zánětů jsou celkově charakterizována vysokým počtem umírajících buněk a zároveň proliferací buněk sousedních, aby bylo množství buněk dané tkáně kompenzováno. Dochází také ke zvýšené produkci p53. Potlačení odezvy na apoptotické signály vlivem inhibičního faktoru migrace makrofágů tedy umožňuje zmírnit poškození organismu vlastní imunitní odpovědí, omezit ztráty zdravých buněk a zároveň podpořit lokální proliferaci na opravu tkání [41].

Pokud je přítomnost MIF ve tkáních chronická, mohou buňky s oslabenou funkcí p53 pokračovat v proliferaci i přes poškození DNA a akumulovat tak mutace [17, 41].

4.8 Inhibiční faktor migrace makrofágů a jeho role u nádorových onemocnění

Nádorová onemocnění jsou charakterizována šesti patologickými znaky: soběstačností při proliferaci, lhostejností k signálům zastavujícím proliferaci, vyhýbáním se apoptose, potenciálem pro nelimitovanou replikaci, podporováním angiogeneze a v případě zhoubných nádorů také napadáním okolních tkání a metastazováním [43]. S ohledem na roli zánětlivých signálů v podporování vývoje nádoru se postupně daří odhalovat důležitý vztah mezi expresí MIF, onkogenezí a vývojem nádorových onemocnění [3].

Inhibiční faktor migrace makrofágů je hojně exprimován v širokém spektru lidských nádorových onemocnění. Buňky nádorů pankreatu, prsu, prostaty, střeva, mozku, kůže i plic mají výrazně vyšší hladiny MIF než zdravé buňky stejného typu. V podmínkách *in vivo* byl popsán přímý vliv MIF na proliferaci nádorových buněk. Některé studie také naznačují, že exprese MIF úzce souvisí s agresivitou nádoru, jeho potenciálem tvořit metastázy, a tedy i se závažností a vytrvalostí onemocnění. Ve výzkumu zabývajícím se glioblastomy bylo zjištěno, že nejvyšší hladiny MIF se vyskytují v nekrotických oblastech glioblastomových lézí a uvnitř tumorových buněk, které obklopují cévy. Protože nekrotické oblasti glioblastomů a jiných nádorových útvarů jsou spojovány s velmi nízkým přísunem kyslíku, předpokládá se, že exprese inhibičního faktoru migrace makrofágů je pozitivně regulována hypoxií [44].

Byla nalezena souvislost také mezi hypoxií a koncentrací zánětlivých cytokinů. Biddlestone a jeho spolupracovníci popsali, že lidé, kteří se několik dní vyskytovali v hypoxických podmínkách (například ve vysokých nadmořských výškách) měli v krvi výrazně vyšší hladinu zánětlivých cytokinů než je obvyklé [45].

4.8.1 Nádorová onemocnění a chronické zánětlivé procesy

Stále více výsledků ukazuje, že záněty úzce souvisí s mnoha typy nádorových onemocnění. Zánětlivé procesy, které chrání organismus proti infekcím nebo při poranění, mohou paradoxně vytvářet prostředí, které podporuje růst nádorů a jejich metastazování (viz Tab. 2). Některá chronická zánětlivá onemocnění a infekce se již podařilo přímo asociovat s konkrétními typy nádorů (viz Tab. 3, str. 36). Tento poznatek podporuje například pozorování, že léčba nesteroidními protizánětlivými léčivými snižuje riziko vývoje nádorového onemocnění střeva [17].

Tab. 2 Biologické efekty MIF podporující vznik a vývoj tumorů. (převzato a upraveno z [17])

Funkční aktivita MIF	Role při vývoji nádorů
Inhibice p53	akumulace mutací inhibice apoptosy proliferace buněk
Nepřetržitá aktivace ERK	: zvýšení invazivity inhibice buněčné smrti
Indukce COX2/PGE₂	růst tumoru metastázy
Proliferace a diferenciací endoteliálních buněk	podpora angiogeneze

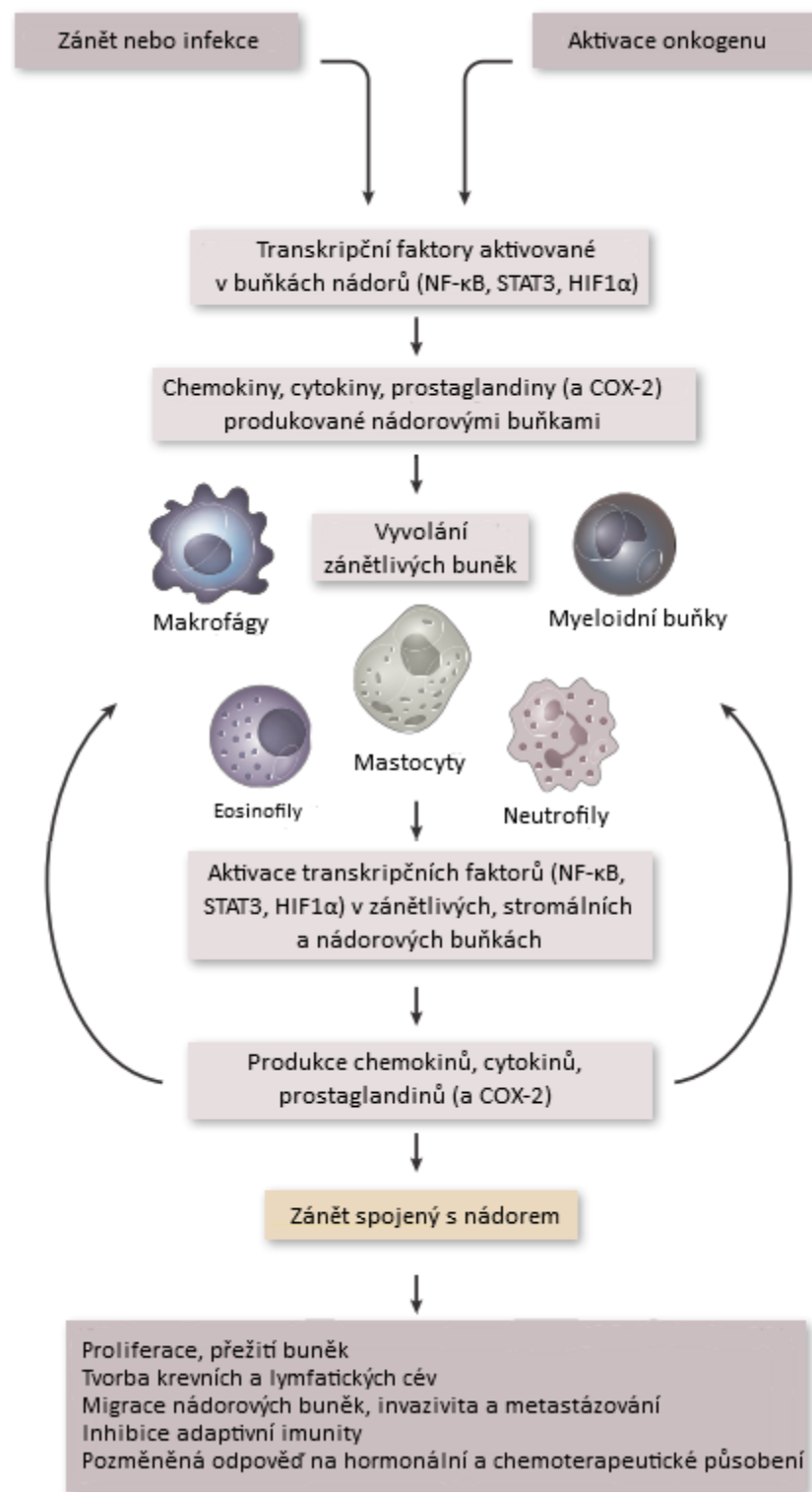
Kromě zvýšené pravděpodobnosti výskytu nádorového onemocnění vlivem dlouhodobé přítomnosti zánětu v organismu některá nádorová onemocnění samotná produkují mediátory zánětu a tím dávají uvnitř tumoru vzniknout zánětlivému prostředí podporujícímu růst. Toto bylo popsáno například u karcinomu prsu (viz Obr. 15, str. 37) [46].

Ačkoliv existuje souvislost mezi nádorovým onemocněním a zánětem, je nutné objasnit ještě několik otázek. Například, zda je samotný zánět dostačující k vývoji nádoru nebo zda jsou do vývoje nádorového onemocnění zahrnuty také exogenní karcinogeny, jak napovídají některé dosavadní studie. Další zajímavou otázkou je, zda je možné ovlivnit imunitní systém organismu tak, aby podporoval protinádorovou reakci organismu na úkor podpory vzniku pro nádory prospěšného prostředí.

Odpovědi na tyto otázky by mohly stát na začátku zcela nového přístupu k léčbě nádorových onemocnění [46].

Tab. 3 Chronická zánětlivá onemocnění spojená se zvýšeným rizikem vzniku specifického typu nádorového onemocnění (převzato a upraveno z [17])

Zánětlivé onemocnění	Lokalizace nádorového onemocnění
Barretův syndrom	jícen
infekce <i>Helicobacter pylori</i>	žaludek
Zánětlivá onemocnění střev	střevo
Hepatitida B a C	játra
Záněty související s obezitou	ledviny
Záněty související s kouřením	plíce
Celiakie	lymfatická tkáň
Revmatoidní artritida	lymfatická tkáň
Bilharzióza	močový měchýř
Osteomyelitida	kosti



Obr. 15 Buněčné pochody spojující nádorová onemocnění a záněty. (převzato a upraveno z [46])

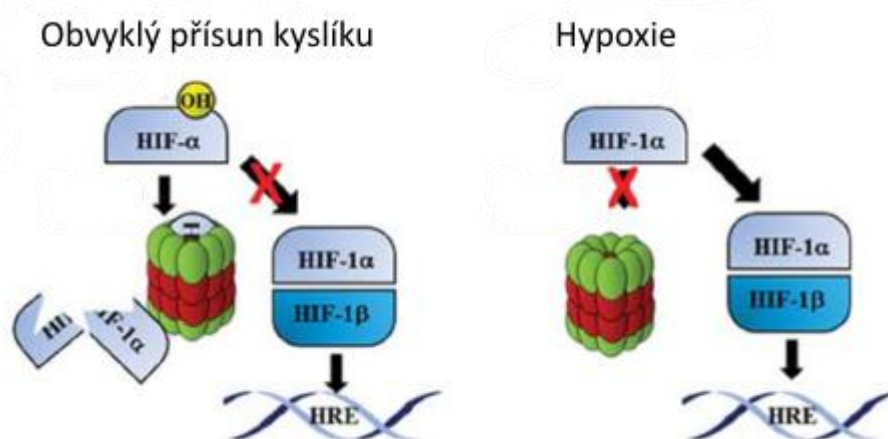
4.8.2 Vliv MIF na angiogenezi

Angiogeneze je proces tvorby nových krevních cév, kterého se účastní mnoho různých faktorů jako bazální fibroblastový růstový faktor je (bFGF, z angl. “basic fibroblast growth factor”), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF, z angl. “vascular endothelial growth factor”) nebo angiopoetin. Pro vývoj nádoru a metastáz je zcela zásadní. Bylo prokázáno, že u pacientů trpících neuroblastomy s mnoha metastázami byla vaskulatura v místě nádoru výrazně vyvinutější. Další zdroje uvádějí, že stupeň vývoje vaskulatury nepřímo koreluje s šancí pacienta na přežití. Jednou z nejdůležitějších aktivit inhibičního faktoru migrace makrofágů při vývoji nádoru je právě podpora angiogeneze [47].

Bez angiogeneze nemůže docházet ke zvětšování nádoru, protože by střed nádoru nebyl dostatečně zásoben. V rostoucím tumoru se nádorové buňky dostávají do stresových hypoxických podmínek, které způsobí, že prekursorové endoteliální buňky produkují faktory podporující tvorbu nových cév. Důležitým faktorem podporujícím angiogenezi je HIF-1 (hypoxií indukovaný faktor 1, z angl. “hypoxia inducible factor 1”), který podporuje expresi MIF a hlavně expresi proangiogenních faktorů. Také samotný MIF je schopen indukovat sekreci proangiogenních faktorů. Aktivuje mitogenem aktivovanou proteinkinasovou signalizaci (MAPK) a také signalizační dráhu fosfatidylinositol 3-kinasy, které vedou ke zvýšené sekreci bFGF a VEGF. Souvislost mezi MIF a faktory podporujícími angiogenezi byla nalezena v tumoru žaludku, hepatocelulárním karcinomu, glioblastomu nebo nádoru esofágu [48].

Inhibiční faktor migrace makrofágů indukuje angiogenezi díky své schopnosti podporovat diferenciaci cévních endoteliálních buněk. V glioblastomových buňkách byla sledována zvýšená exprese MIF, která je indukována hypoxií a hypoglykemií, oba tyto stavy jsou považovány za klasické aktivátory angiogeneze [7]. Je známo, že hypoxické podmínky v solidních nádorech indukují expresi určitých genů, které poskytují nádorovým buňkám evoluční výhodu, neboť jim umožňují přežití a růst v těchto podmínkách [17]. Podobný efekt nedostatečného množství kyslíku na zvýšení hladiny MIF byl pozorován i v dalších typech nádorových buněk. Byla také potvrzena pozitivní korelace mezi koncentracemi inhibičního faktoru migrace makrofágů a vaskulárního endoteliálního faktoru [7].

Do rodiny hypoxií indukovaných faktorů patří transkripční faktory, které rozpoznávají množství kyslíku v okolí a v případě hypoxie zahajují transkripční program tvořící důležitou část buněčné odpovědi. HIF-1 je heterodimerní transkripční faktor sestávající z konstitutivně exprimované HIF-1 β podjednotky v jádře a podjednotky HIF-1 α v cytoplasmě, jejíž přítomnost je regulovaná dostupností kyslíku (viz Obr. 16). V běžných podmínkách za přítomnosti kyslíku dochází k polyubiquitylaci HIF-1 α a jeho degradaci v proteasomu. V hypoxických podmínkách není HIF-1 α označen k odbourání v proteasomu a může přecházet do jádra, kde tvoří s podjednotkou HIF-1 β dimer HIF-1, který aktivuje cílové geny obsahující v promotorovém úseku na hypoxii odpovídající elementy (HRE, z angl. “hypoxia response elements”) [45].

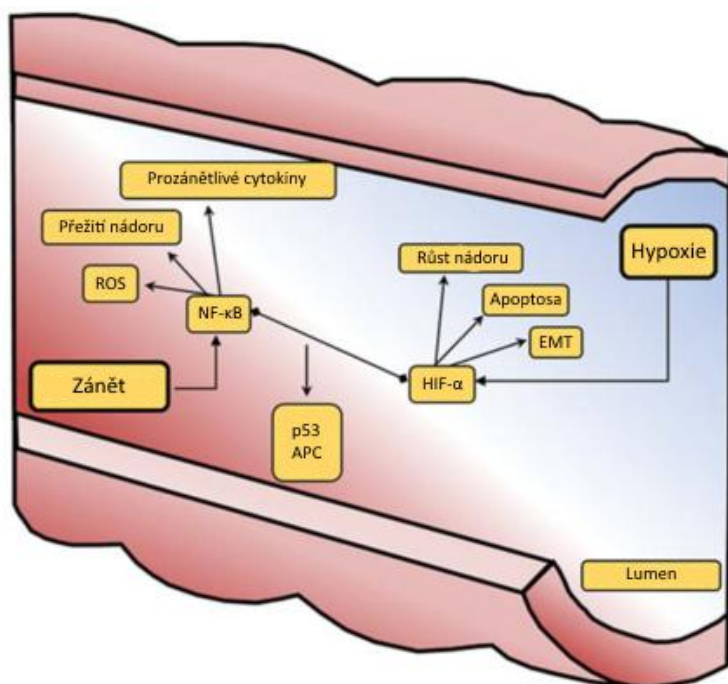


Obr. 16 Schéma funkce transkripčních faktorů HIF-1 v běžných a hypoxických podmínkách. Za přítomnosti kyslíku dochází k degradaci HIF-1 α v proteasomu. V hypoxických podmínkách HIF-1 α putuje do jádra, asociuje s podjednotkou HIF-1 β a aktivuje geny obsahující HRE v promotorovém úseku. (převzato a upraveno z [45])

HIF-1 je schopen regulovat expresi stovky cílových genů účastnících se mnoha fyziologických funkcí včetně angiogeneze, erytropoézy, metabolismu, autofágie, apoptosy a jiných fyziologických odpovědí na hypoxické podmínky. Některé z těchto cílových genů jsou společné i pro hlavní transkripční faktor prozánětlivých reakcí NF- κ B (z angl. “nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”)[45].

Vzájemné ovlivňování pochodů odpovídajících na stres způsobený hypoxií a zánětem je typické pro onemocnění jako je revmatoidní artritida, zánětlivá onemocnění střev nebo rakovina střeva a mnoho dalších (viz Obr. 17, str. 40) [45].

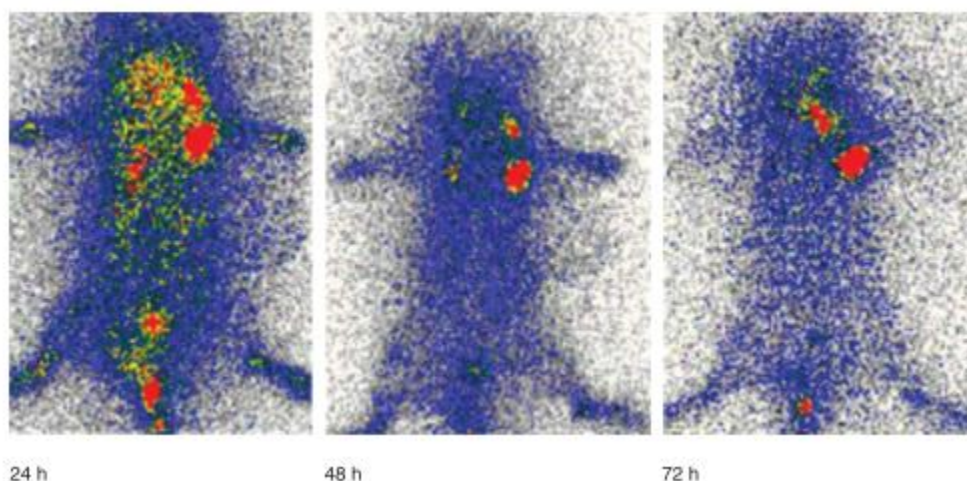
Toto propojení však nehraje roli pouze u patologických stavů. Například u zdravých jedinců žijících ve vysokých nadmořských výškách dochází k prodloužené aktivaci HIF-1, která vede k redukci aktivity NF- κ B a tedy k útlumu imunitní odpovědi organismu. Tyto poznatky však vyžadují další studium [45].



Obr. 17 Vzájemné ovlivnění NF- κ B a HIF- α v intestinálním lumen při rakovině střeva. Pro toto onemocnění jsou typické hypoxické a zanícené oblasti. (ROS – reaktivní molekuly kyslíku, EMT – změna epiteliálních buněk na mezenchymální, z angl. “epithelial to mesenchymal transition”, APC – tumor supresorový gen, z angl. “adenomatous polyposis coli”) (převzato a upraveno z [45])

4.9 Využití inhibičního faktoru migrace makrofágů k diagnostickým účelům

Zhang a kolektiv provedli studii hledající vhodný marker hepatocelulárního karcinomu, který by umožnil odhalit recidivu tohoto onemocnění v raném stadiu. V testech byly použity radioaktivně značené monoklonální protilátky proti MIF. Radiografické snímky myších modelů pak poskytovaly zřetelně lokalizovaná ložiska nádorových buněk (viz Obr. 18). Studie farmakodynamických vlastností protilátek proti inhibičnímu faktoru migrace makrofágů navíc prokázaly, že tato látka dosáhla dobrého hodnocení v oblasti rozlišení cílových buněk. Ve zdravých tkáních docházelo pouze k její nízké akumulaci. Pomocí těchto protilátek bylo dosaženo lepších výsledků než při testování značených protilátek proti IgG [49].

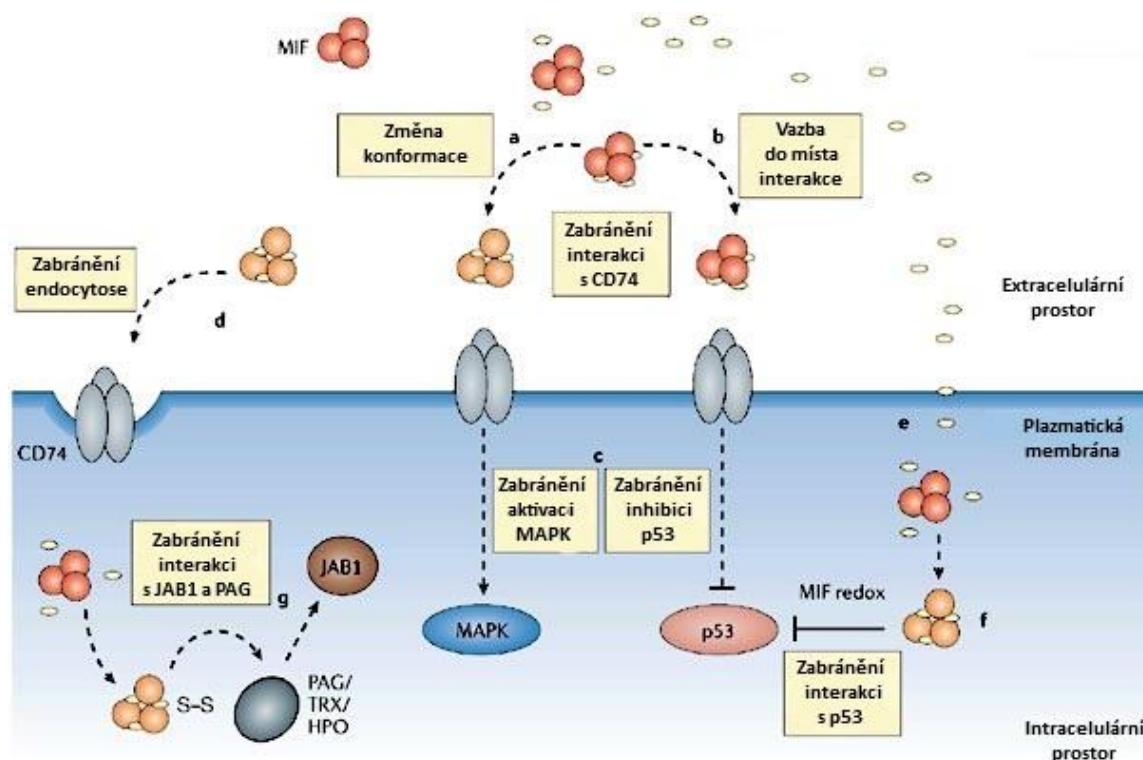


Obr. 18 Radiografické snímky hepatocelulárního karcinomu v myších modelových organismech získané použitím radioaktivně značené protilátky proti MIF. (převzato a upraveno [49])

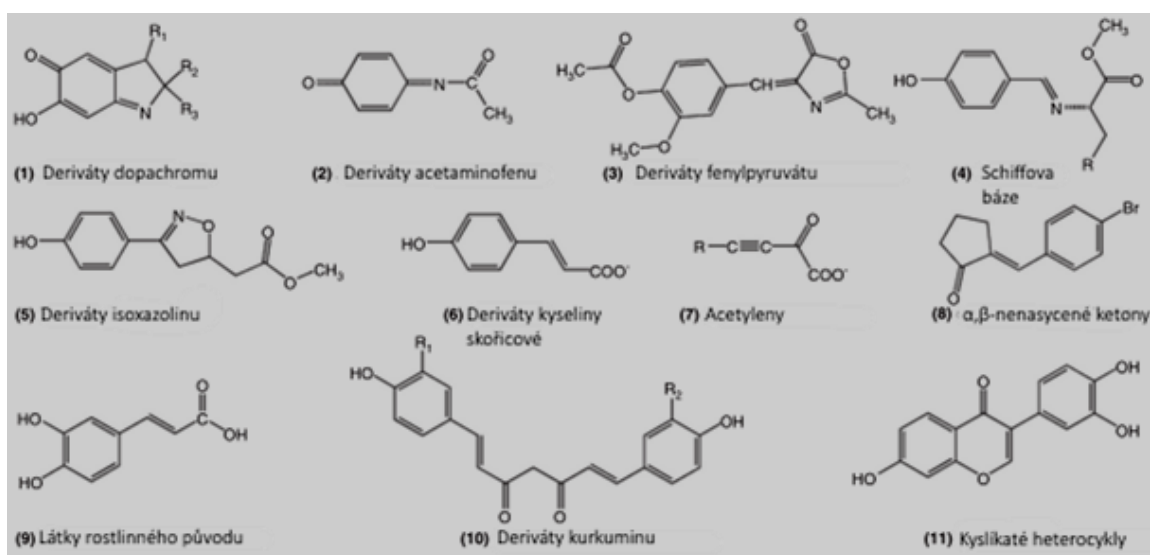
Ve studii zabývající se nádorovým onemocněním vaječníků byly prováděny testy zahrnující stanovení šesti sérových markerů, MIF, leptinu, prolaktinu, osteopontinu, insulinového růstového faktoru a nádorového antigenu 125). Tato kombinace biomarkerů vykazovala vysokou citlivost (95 %) i specifitu (99 %) pro detekci nádoru vaječníků a mohla by tak být slibnou metodou pro detekci recidivy tohoto onemocnění v časném stadiu [3].

4.10 Inhibitory MIF

Na základě svých fyziologických, patofyziologických a katalytických aktivit byl inhibiční faktor migrace makrofágů vybrán jako významný cíl terapeutického zásahu pro nízkomolekulární, na protilátkách založená léčiva účinkující proti cytokinům. V současné době se vývoj nízkomolekulárních inhibitorů MIF soustředí převážně na racionální design založený na struktuře MIF zaměřený na tautomerasové aktivní místo molekuly MIF. Existuje několik mechanismů, jak mohou malé molekuly inhibovat tautomerasovou aktivitu MIF : (i) navázáním na aktivní místo; (ii) allosterickou inhibicí; (iii) kovalentní modifikací řetězců aminokyselin v aktivním místě, (iv) rozrušením aktivního místa pomocí sloučeniny indukující disociaci trimeru, který je pro tautomerasovou aktivitu nezbytný; nebo (v) stabilizací monomeru MIF a prevencí jeho opětovné asociace a tvorby trimeru (viz Obr. 19) [50].



Obr. 19 Některá z možných míst zásahu inhibitorů MIF. Inhibitory MIF se mohou vázat do místa interakce s receptorem CD74, měnit konformaci molekuly MIF nebo bránit endocytose. Navázání inhibitoru brání aktivaci MAPK kinasové dráhy a interakci s dalšími molekulami v intracelulárním prostoru. (převzato a upraveno z [38])



Obr. 20 Jedenáct základních tříd inhibitorů MIF. (převzato a upraveno z [51])

Existuje minimálně jedenáct tříd inhibitorů tautomerasové aktivity MIF (viz Obr. 20) [52]. V minulých letech se podařilo objevit čtyři potenciálně využitelné inhibitory, jejichž hodnoty IC_{50} , tedy množství daného inhibitoru schopné způsobit inhibici daného jevu v 50 % případů, byly nižší než $5\mu M$, některé sloučeniny dokázaly inhibovat tautomerasovou aktivitu MIF i při tak nízké koncentraci jako $0,5\mu M$. Takto slibné inhibitory MIF by měly být vhodnými kandidáty pro léčbu rakovinných a zánětlivých onemocnění. Nedávno byl odhalen sebevražedný inhibitor MIF 4-jodo-6-fenylpyrimidin (4-IPP), který se kovalentně váže na N-terminální prolin a ireverzibilně tak inhibuje invazivitu MIF-dependentních nádorových buněk [51]. Inhibitor 4-IPP je také schopen redukovat sekreci MIF a jeho pravděpodobného transportního proteinu p115 z makrofágů. Mohl by tedy být potenciálně využit jako selektivní inhibitor p115/MIF sekreční dráhy [14].

V roce 2010 byl objeven první agonista interakce mezi inhibičním faktorem migrace makrofágů a jeho receptorem CD74. Přidání agonisty MIF zvyšuje ERK1/2 fosforylaci a podporuje tak vazbu MIF na CD74, zatímco inkubace společně s antagonistou MIF za stejných experimentálních podmínek tento proces silně inhibuje. Jako první nízkomolekulární inhibitor MIF schopný modifikovat a rozrušit trimerní strukturu byl objeven ebselen (2-fenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-1). Ačkoliv trimer MIF je velmi stabilní, jednotlivé monomery jsou velmi nestabilní a mají tendenci po rozrušení trimerní struktury rychle agregovat. Nedávno objeveným novým

allosterickým inhibítozem MIF je p425, který dramaticky inhibuje schopnost MIF katalyzovat tautomerizační reakci 4-hydroxy-fenylpyruvátu a také blokuje interakci mezi MIF a jeho receptorem CD74 [51].

Vývoj efektivního a zároveň selektivního inhibitoru MIF je zásadní pro vývoj nových farmakologických terapií pro nemoci asociované s MIF, tedy pro léčbu zánětlivých, autoimunitních nebo nádorových onemocnění. Současná strategie cílí na vývoj nízkomolekulárních inhibitorů tautomerasové a biologické aktivity MIF. Další možností je návrh nových sloučenin, které by mohly inhibovat enzymovou aktivitu inhibičního faktoru migrace makrofágů a zároveň blokovat jeho vazbu na receptor CD74 nebo vázat receptor CXCR4 [51].

Experimentální výsledky ukazují, že snížená exprese MIF tlumí buněčnou proliferaci, růst tumoru a metastazování *in vitro* i v modelových organismech. Tento jev byl pozorován ve výzkumech týkajících se neuroblastomů, nádorů močového měchýře, melanomů nebo nádorů střeva [47].

5 Závěr

Inhibiční faktor migrace makrofágů je cytokin ovlivňující lidský organismus na mnoha úrovních. Porozumění mechanismům účinků tohoto proteinu pomůže lépe chápat příčiny vzniku některých typů nádorových onemocnění a tyto poznatky potenciálně využít i k léčbě nádorových a zánětlivých onemocnění. Dosavadní studie dosahují pozitivních výsledků při použití inhibitorů MIF ke zpomalení proliferace nádorových útvarů a prodloužení doby života modelových organismů.

6 Citovaná literatura

- [1] "Podpora zdraví a zdravotní politika v prevenci nádorových onemocnění, SZÚ." [Online]. Dostupné na: <http://www.szu.cz/tema/prevence/podpora-zdravi-a-zdravotni-politika-v-prevenci-nadorovych>. [Zobrazeno: 18-May-2015].
- [2] "WHO | Cancer." Dostupné na: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> [Zobrazeno: May 17, 2015].
- [3] A. Manuscript, "NIH Public Access," *Changes*, vol. 29, no. 6, pp. 997–1003, 2012.
- [4] "Nádorová onemocnění, SZÚ." [Online]. Dostupné na: <http://www.szu.cz/tema/prevence/nadorova-onemocneni>. [Zobrazeno: 17-May-2015].
- [5] J. P. Bach, B. Rinn, B. Meyer, R. Dodel, and M. Bacher, "Role of MIF in inflammation and tumorigenesis," *Oncology*, vol. 75, pp. 127–133, 2008.
- [6] B. R. Bloom and B. Bennett, "Mechanism of a Reaction in Vitro Associated with Delayed-Type Hypersensitivity," *Science (80-.)*, vol. 153, no. 3731, pp. 80–82, 1966.
- [7] J.-P. Bach, O. Deuster, M. Balzer-Geldsetzer, B. Meyer, R. Dodel, and M. Bacher, "The role of macrophage inhibitory factor in tumorigenesis and central nervous system tumors," *Cancer*, vol. 115, pp. 2031–2040, 2009.
- [8] R. Bucala and S. C. Donnelly, "Macrophage Migration Inhibitory Factor: A Probable Link between Inflammation and Cancer," *Immunity*, vol. 26, no. March, pp. 281–285, 2007.
- [9] J. Bernhagen, T. Calandra, and R. Bucala, "Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features," *J. Mol. Med.*, vol. 76, no. 3–4, pp. 151–161, 1998.
- [10] T. Calandra and T. Roger, "Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity," *Nat. Rev. Immunol.*, 2003.
- [11] "MIF - Macrophage migration inhibitory factor - Homo sapiens (Human)." [Online]. Dostupné na: <http://www.uniprot.org/uniprot/P14174>. [Zobrazeno: 14-Mar-2015].
- [12] R. Bucala, "MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response," *FASEB J.*, vol. 10, pp. 1607–1613, 1996.
- [13] M. Merk, R. a. Mitchell, S. Endres, and R. Bucala, "D-dopachrome tautomerase (D-DT or MIF-2): Doubling the MIF cytokine family," *Cytokine*, vol. 59, no. 1, pp. 10–17, 2012.
- [14] M. Merk, J. Baugh, S. Zierow, L. Leng, U. Pal, S. J. Lee, A. D. Ebert, Y. Mizue, J. O. Trent, R. Mitchell, W. Nickel, P. B. Kavathas, J. Bernhagen, and R. Bucala, "The Golgi-associated protein p115 mediates the secretion of macrophage migration inhibitory factor," *J. Immunol.*, vol. 182, no. 11, pp. 6896–6906, 2009.
- [15] H. W. Sun, J. Bernhagen, R. Bucala, and E. Lolis, "Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 93, no. 11, pp. 5191–5196, 1996.
- [16] "Polymorphism," 2015. Dostupné na: <http://ghr.nlm.nih.gov/glossary=polymorphism> [Zobrazeno: May 17, 2015].

- [17] H. Conroy, L. Mawhinney, and S. C. Donnelly, "Inflammation and cancer: Macrophage migration inhibitory factor (MIF)-the potential missing link," *Qjm*, vol. 103, no. 11, pp. 831–836, 2010.
- [18] R. Kleemann, a Kapurniotu, R. W. Frank, a Gessner, R. Mischke, O. Flieger, S. Jüttner, H. Brunner, and J. Bernhagen, "Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase.," *J. Mol. Biol.*, vol. 280, pp. 85–102, 1998.
- [19] H. W. Sun, M. Swope, C. Cinquina, S. Bedarkar, J. Bernhagen, R. Bucala, and E. Lolis, "The subunit structure of human macrophage migration inhibitory factor: evidence for a trimer.," *Protein Eng.*, vol. 9, no. 8, pp. 631–635, 1996.
- [20] M. Vujicic, L. Senerovic, I. Nikolic, T. Saksida, S. Stosic-Grujicic, and I. Stojanovic, "The critical role of macrophage migration inhibitory factor in insulin activity," *Cytokine*, vol. 69, no. 1, pp. 39–46, 2014.
- [21] K. Bendrat, Y. Al-Abed, D. J. E. Callaway, T. Peng, T. Calandra, C. N. Metz, and R. Bucala, "Biochemical and mutational investigations of the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor," *Biochemistry*, vol. 36, no. 97, pp. 15356–15362, 1997.
- [22] E. Rosengren, R. Bucala, P. Aman, L. Jacobsson, G. Odh, C. N. Metz, and H. Rorsman, "The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction.," *Mol. Med.*, vol. 2, no. 1, pp. 143–9, 1996.
- [23] A. al-Roof Higazi, J. F. Aceto, D. Kniss, R. Upson, R. Cohen, D. A. Dichek, and D. B. Cines, "Unesterified long chain fatty acids inhibit the binding of single chain urokinase to the urokinase receptor.," *Biochemistry*, vol. 35, no. 21, pp. 6884–90, 1996.
- [24] K. A, C. B, and Y. R, "Effects of lipids on nucleotide inhibition of wheat-germ aspartate transcarbamoylase: evidence of an additional level of control?," 1996.
- [25] R. Kleemann, R. Mischke, A. Kapurniotu, H. Brunner, and J. Bernhagen, "Specific reduction of insulin disulfides by macrophage migration inhibitory factor (MIF) with glutathione and dihydrolipoamide: Potential role in cellular redox processes," *FEBS Lett.*, vol. 430, pp. 191–196, 1998.
- [26] E. Rosengren, P. Åman, S. Thelin, C. Hansson, S. Ahlfors, P. Björk, L. Jacobsson, and H. Rorsman, "The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase," *FEBS Lett.*, vol. 417, no. 1, pp. 85–88, 1997.
- [27] J. Boniface and L. Reichert, "Evidence for a novel thioredoxin-like catalytic property of gonadotropic hormones," *Science (80-.)*, vol. 247, no. 4938, pp. 61–64, 1990.
- [28] J. Bick, V. Nguyen, L. Leng, M. Piecychna, M. J. Crowley, R. Bucala, L. C. Mayes, and E. L. Grigorenko, "Preliminary associations between childhood neglect, MIF, and cortisol: potential pathways to long-term disease risk.," *Dev. Psychobiol.*, vol. 57, no. 1, pp. 131–9, 2015.
- [29] O. A. Cherepkova, E. M. Lyutova, T. B. Eronina, and B. Y. Gurvits, "Chaperone-like activity of macrophage migration inhibitory factor.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 38, no. 1, pp. 43–55, 2006.
- [30] C. Toso, J. a. Emamaullee, S. Merani, and a. M. J. Shapiro, "The role of macrophage migration inhibitory factor on glucose metabolism and diabetes," *Diabetologia*, vol. 51, no. 11, pp. 1937–1946, 2008.

- [31] "Insulin secretion and sensitivity - Type 1 diabetes mellitus - Diapedia, The Living Textbook of Diabetes." [Online]. Dostupné na: <http://www.diapedia.org/type-1-diabetes-mellitus/insulin-secretion-and-sensitivity>. [Zobrazeno: 03-May-2015].
- [32] H. Flaster, J. Bernhagen, T. Calandra, and R. Bucala, "The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity.," *Mol. Endocrinol.*, vol. 21, no. 6, pp. 1267–1280, 2007.
- [33] R. P. Donn and D. W. Ray, "Macrophage migration inhibitory factor: Molecular, cellular and genetic aspects of a key neuroendocrine molecule," *J. Endocrinol.*, vol. 182, pp. 1–9, 2004.
- [34] H. Fan, W. Kao, Y. H. Yang, R. Gu, J. Harris, G. Fingerle-Rowson, R. Bucala, D. Ngo, E. Beaulieu, and E. F. Morand, "Macrophage Migration Inhibitory Factor Inhibits the Antiinflammatory Effects of Glucocorticoids via Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper," *Arthritis Rheumatol.*, vol. 66, no. 8, pp. 2059–2070, 2014.
- [35] R. a Mitchell, H. Liao, J. Chesney, G. Fingerle-Rowson, J. Baugh, J. David, and R. Bucala, "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 1, pp. 345–350, 2002.
- [36] L. Leng, C. N. Metz, Y. Fang, J. Xu, S. Donnelly, J. Baugh, T. Delohery, Y. Chen, R. a Mitchell, and R. Bucala, "MIF signal transduction initiated by binding to CD74.," *J. Exp. Med.*, vol. 197, no. 11, pp. 1467–1476, 2003.
- [37] X. Shi, L. Leng, T. Wang, W. Wang, X. Du, J. Li, C. McDonald, Z. Chen, J. W. Murphy, E. Lolis, P. Noble, W. Knudson, and R. Bucala, "CD44 Is the Signaling Component of the Macrophage Migration Inhibitory Factor-CD74 Receptor Complex," *Immunity*, vol. 25, no. October, pp. 595–606, 2006.
- [38] E. F. Morand, M. Leech, and J. Bernhagen, "MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 5, no. 5, pp. 399–410, 2006.
- [39] "Figure 2 : MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis : Nature Reviews Drug Discovery." [Online]. Dostupné na: http://www.nature.com/nrd/journal/v5/n5/fig_tab/nrd2029_F2.html. [Zobrazeno: 06-May-2015].
- [40] H.-R. Chen, Y.-C. Chuang, C.-H. Chao, and T.-M. Yeh, "Macrophage migration inhibitory factor induces vascular leakage via autophagy," *Biol. Open*, pp. 1–9, 2015.
- [41] J. D. Hudson, M. a Shoaibi, R. Maestro, a Carnero, G. J. Hannon, and D. H. Beach, "A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity.," *J. Exp. Med.*, vol. 190, no. 10, pp. 1375–1382, 1999.
- [42] "Figure - Nature Genetics." [Online]. Available: http://www.nature.com/ng/journal/v36/n1/fig_tab/ng0104-7_F1.html. [Zobrazeno: 06-May-2015].
- [43] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The Hallmarks of Cancer," *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, 2000.
- [44] B. E. Rendon, S. S. Willer, W. Zundel, and R. a. Mitchell, "Mechanisms of macrophage migration inhibitory factor (MIF)-dependent tumor microenvironmental adaptation," *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 86, no. 3, pp. 180–185, 2009.

- [45] J. Biddlestone, D. Bandarra, and S. Rocha, "The role of hypoxia in inflammatory disease (Review)," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 35, no. 4, pp. 859–869, 2015.
- [46] A. Mantovani, A. Mantovani, P. Allavena, P. Allavena, A. Sica, A. Sica, F. Balkwill, and F. Balkwill, "Cancer-related inflammation.," *Nature*, vol. 454, no. July, pp. 436–44, 2008.
- [47] Y. Ren, H. M. Chan, J. Fan, Y. Xie, Y. X. Chen, W. Li, G. P. Jiang, Q. Liu, a Meinhardt, and P. K. H. Tam, "Inhibition of tumor growth and metastasis in vitro and in vivo by targeting macrophage migration inhibitory factor in human neuroblastoma.," *Oncogene*, vol. 25, no. December 2005, pp. 3501–3508, 2006.
- [48] S. N. Babu, G. Chetal, and S. Kumar, "Macrophage migration inhibitory factor: a potential marker for cancer diagnosis and therapy.," *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, vol. 13, no. 5, pp. 1737–44, 2012.
- [49] C. Zhang, T. Liang, J. Song, S. Jiang, L. Qu, and G. Hou, "Evaluation of macrophage migration inhibitory factor as an imaging marker for hepatocellular carcinoma in murine models.," *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 46, no. October 2010, pp. 720–726, 2011.
- [50] H. Ouertatani-Sakouhi, F. El-Turk, B. Fauvet, M.-K. Cho, D. Pinar Karpinar, D. Le Roy, M. Dewor, T. Roger, J. Bernhagen, T. Calandra, M. Zweckstetter, and H. a Lashuel, "Identification and characterization of novel classes of macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibitors with distinct mechanisms of action.," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 34, pp. 26581–26598, 2010.
- [51] L. Xu, Y. Li, H. Sun, X. Zhen, C. Qiao, S. Tian, and T. Hou, "Current developments of macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibitors.," *Drug Discov. Today*, vol. 18, no. 11–12, pp. 592–600, 2013.
- [52] J. Garai and T. Lorand, "Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Tautomerase Inhibitors as Potential Novel Anti-Inflammatory Agents: Current Developments.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 16, no. 9, pp. 1091–1114, 2009.

„Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.“

Jméno, příjmení a adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka